

Aus dem medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Genotyp-/Phänotyp-Analyse und klinische
Charakterisierung von 25 Familien mit
familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie
und Nephrokalzinose (FHHNC)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)**

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Linda Schneider
aus Gießen

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 10.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. H. W. Seyberth

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Koch

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose	1
1.2.1	Eine Übersicht und klinische Beschreibung der Erkrankung	1
1.2.2	Mutationen im CLDN16-Gen als ursächlicher genetischer Defekt der FHHNC-Erkrankung	5
1.3	Klinische Einteilung monogener Magnesiumverlusterkrankungen	9
1.3.1	Primäre Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie	10
1.3.2	Isolierte Hypomagnesiämie, autosomal dominant und rezessiv	10
1.3.3	Erkrankungen mit Defekten des $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -sensing-Rezeptor	11
1.3.4	Salzverlust-Tubulopathien, Bartter-ähnliche Syndrome	13
1.4	Magnesiumstoffwechsel	15
1.4.1	Physiologische Grundlagen der Magnesiumhomöostase	15
1.4.2	Intestinale Resorption und renale Ausscheidung von Magnesium	16
1.5	Hypomagnesiämie im klinischen Alltag	21
1.5.1	Ursachen einer Hypomagnesiämie	21
1.5.2	Symptome einer Hypomagnesiämie	22
1.5.3	Diagnostische Schwierigkeiten eines Magnesiummangels	22
1.5.4	Therapie eines Magnesiummangels	23
1.6	Fragestellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Patienten und Familien	26
2.1.1	Phänotypisierung der Patienten	27
2.1.2	Familienuntersuchung	29
2.2	Materialien	31
2.2.0	Allgemeine Materialien	31
2.2.1	Materialien für DNA-Extraktion aus Vollblut	32
2.2.2	Materialien für PCR	33
2.2.3	Materialien für Gelelektrophorese	34
2.2.4	Materialien für SSCP	34
2.2.5	Materialien für DNA-Sequenzierung	35

2.3	Methoden	37
2.3.1	DNA-Extraktion aus Vollblut	37
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.3.3	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	42
2.3.4	SSCP	46
2.3.5	DNA-Sequenzierung	49
3	Ergebnisse	56
3.1	Phänotypisierung der Patienten	56
3.1.1	Klinische Präsentation	56
3.1.2	Laborchemische Parameter	59
3.1.3	Renale Sonographie und Nierenbiopsie	59
3.1.4	Klinischer Verlauf der Erkrankung	60
3.1.5	Nierenfunktion in Abhängigkeit der Dauer der Erkrankung	62
3.2	Genotypisierung der Patienten	64
3.2.1	Mutationsanalyse	64
3.2.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelation und intrafamiliäre Variabilität	66
3.3	Familienuntersuchung	68
3.3.1	Klinische Charakterisierung	68
3.3.2	Genetische Charakterisierung	69
4	Diskussion	73
4.1	Analyse der Patienten-Phänotypisierung	74
4.1.1	Rasches Fortschreiten der Niereninsuffizienz – ein typisches Merkmal der FHHNC	75
4.1.2	Welche Faktoren spielen eine Rolle in der Entwicklung von Nephrokalzinose und Nephrourolithiasis?	77
4.1.3	Claudin-16 – ein wichtiges Strukturprotein	80
4.2	Analyse der Patienten-Genotypisierung	82
4.2.1	Founder-Effekt für die Mutation Leu151Phe	82
4.2.2	Kontroverse um den Translationsbeginn von Claudin-16 – Interspezies-Sequenzvergleiche von Claudin-16	83
4.2.3	Claudine sind wichtige Komponenten für Struktur und Funktion von Tight Junctions	85

4.2.4	Funktionen von Tight Junctions	87
4.2.5	Claudin-16 bildet einen nichtselektiven parazellulären Kationenkanal	88
4.2.6	Claudin-16-Mutationen mit kompletten und partiellem Funktionsverlust – Genotyp-Phänotyp-Korrelation	92
4.2.7	CLDN16-Mutationen mit Defekten im intrazellulären „Trafficking“	94
4.2.8	Mutationen im Gen für Claudin-16 oder Claudin-19 verursachen FHHNC – beide Claudine generieren die Kationenselektivität der Tight Junctions in synergistischer Weise	96
4.3	Familienuntersuchung	101
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	105
7	Anhang	126
7.1	Originalfragebogen	126
7.2.	Verwendete Abkürzungen	133
7.3.	Akademische Lehrer	138
7.5.	Danksagung	139

1 Einleitung

1.1 Einführung

Erbliche Erkrankungen des Tubulusapparates der Niere, sogenannte hereditäre Tubulopathien, beeinflussen die renalen Regulationsmechanismen des Ionenhaushaltes. Erkrankungen dieses Formenkreises gehen häufig mit pathologischen Elektrolytverschiebungen, Blutdruckveränderungen und einer Verschlechterung der Nierenfunktion einher. Für einige erbliche Erkrankungen dieser Art konnten in der Vergangenheit Genmutationen identifiziert werden, die mit einer Beeinträchtigung der Funktion tubulärer Ionentransporter einhergehen [López-Nieto und Brenner, 1997].

Hereditäre Tubulopathien mit Magnesiumverlustsyndrom sind seltene angeborene Erkrankungen mit renalem Magnesiumverlust, über deren molekulargenetische Grundlagen und die Pathogenese ihrer Entstehung bisher nur wenig bekannt war. In jüngerer Zeit konnte die Aufklärung molekularer Grundlagen und Identifizierung von Genmutationen als Ursache gestörter Magnesiumtransportprozesse im Tubulusapparat der Niere einen Beitrag zum besseren Verständnis des Magnesiumstoffwechsels leisten. Die erste Magnesiumverlusterkrankung, deren molekulargenetische Aufklärung gelang [Simon et al., 1999] ist die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose, kurz FHHNC genannt (OMIM 248250).

Die vorliegende Arbeit stellt molekulargenetische Untersuchungen für ein großes Patientenkollektiv vor, die sich mit den klinischen Symptomen der FHHNC präsentierten und ergänzt umfangreiche klinische Daten der Patienten und Familienangehörigen.

1.2 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose

1.2.1 Eine Übersicht und klinische Beschreibung der Erkrankung

Die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) ist eine seltene autosomal rezessive tubuläre Nierenerkrankung und wird nach den Erstbeschreibern auch als Michelis-Castrillo Syndrom bezeichnet. Die Erkrankung ist durch einen massiven Verlust von Magnesium und Kalzium im Urin charakterisiert. Es kommt zu einer ausgeprägten Hypomagnesiämie und alle Patienten zeigen eine

bilaterale Nephrokalzinose. Die Diagnose einer FHHNC-Erkrankung wird aufgrund der Trias bestehend aus Hypomagnesiämie, ausgeprägter Hyperkalziurie und Nephrokalzinose gestellt und gibt der Erkrankung den Namen.

Die Erkrankung wurde erstmalig 1972 von Michelis et al. bei einem Geschwisterpaar beschrieben [Michelis et al., 1972]. Die Patienten wiesen neben den Kardinalsymptomen zusätzlich eine Polyurie/Polydipsie, rezidivierende Harnwegsinfekte und eine Dystrophie auf. Zusätzlich fielen eine inkomplette distal-renal-tubuläre Azidose (dRTA) und erniedrigte Serumbicarbonat Spiegel aufgrund renalem Bicarbonatverlust auf. Laborchemische Veränderungen wie Hypokalziämie, Hypophosphatämie, eine erhöhte alkalische Phosphatase und ein erhöhtes Parathormon (PTH) waren nur bei einer Patientin auffällig und gingen mit cerebralen Krämpfen und rachitischen Veränderungen des Skelettes einher. Ein erhöhter PTH-Spiegel schien nicht im Zusammenhang mit den renalen Magnesium- und Bicarbonatverlusten zu stehen. Bei drei Geschwistern und den Eltern zeigten sich keine dieser Veränderungen. Auffällig war aber, dass ein gesundes Geschwister-Kind anamnestisch an Harnwegsinfekten litt. Michelis et al. schlossen bereits auf einen renal-tubulären Defekt. Castrillo et al. [Castrillo et al., 1983] beschrieben weitere sieben Patienten mit bilateraler Nephrokalzinose, Hypomagnesiämie und Hyperkalziurie. Eine Hypokalziämie zeigte sich wie zuvor nicht als beständige Auffälligkeit und keiner der Patienten litt an Hypokaliämie. Als ursächlich wurden von Castrillo et al. ebenso ein abnormaler Transportmechanismus im renalen Tubulussystem vermutet.

Seit der Erstbeschreibung sind Patienten von mindestens 30 verschiedenen Familien beschrieben [Runeberg et al., 1975; Manz et al., 1978; Meier et al., 1979; Evans et al., 1981; Ulmann et al., 1985; Rodriguez-Soriano et al., 1987; Heras et al., 1987; Kanaka et al., 1991; Ortiz et al., 1992; Richard et al., 1992; Rodriguez-Soriano und Vallo, 1994; Torralbo et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Praga et al., 1995; Morger et al., 1999; Mourani et al., 1999; Benigno et al., 2000; Gregoric et al., 2000; Aguado et al., 2001]. Seit der genetische Defekt der FHHNC 1999 durch Simon et al. aufgeklärt werden konnte, wurden etwa 50 zusätzliche Familien mit FHHNC beschrieben und mit dem gefundenen genetischen Defekt assoziiert [Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Weber et al., J Am Soc Nephrol., Sep 2001; Blanchard et al., 2001; Kuwertz-Bröking et al., 2001; Wolf et al., 2002; Müller et al., 2003; Tajima et al., 2003; Kari et al., 2003; Loris Pablo et al., 2004; Tasic et al., 2005; Kang et al., 2005; Kutluturk et al., 2006; Müller et al., Hum Mol Genet., 2006; Müller et al., J Clin Endocrinol Metab., 2006;

Türkmen et al., 2006; Cetrullo et al., 2006; Sikora et al., 2006; Zimmermann et al., 2006; Prabakar et al., 2006; Staiger et al., 2007; Sanjad et al., 2007; Konrad et al., 2008; Al-Elq, 2008; Peru et al., 2008; Vargas-Poussou et al., 2008].

Im Vergleich zu anderen Erkrankungen, die mit einer Hypomagnesiämie einhergehen, wird die FHHNC häufig kompliziert durch ein chronisches Nierenversagen in der frühen Kindheit oder im Jugendalter. In den verschiedenen Publikationen wurden als initiale Symptome häufig wiederholte Harnwegsinfektionen und Polyurie/Polydipsie beschrieben. Mögliche weitere Manifestationssymptome können Nephrolithiasis, Hämaturie, Erbrechen, Bauchschmerzen, Krämpfe, Muskeltetanien und Dystrophie sein, wobei die Ursache der Dystrophie eher in der begleitenden Niereninsuffizienz zu suchen ist [Rodriguez-Soriano et al., 1987]. Zusätzliche biochemische Abnormitäten schließen Hypozitraturie, Hyperurikämie und eine Isothenurie mit ein. Eine Hyperurikämie wird bei der Mehrzahl der Patienten gesehen, selten kommt es aber zu Gichtanfällen. Häufig wird auch eine inkomplette distal-renal-tubuläre Azidose (dRTA) beschrieben, weshalb die FHHNC früher häufig mit dem Krankheitsbild der dRTA in Verbindung gebracht und als eine Frühform der dRTA gesehen wurde. Allerdings ist ein Defekt des renalen Magnesiumhaushaltes nicht typisch bei der primären dRTA [Manz et al., 1978]. Die verminderte Fähigkeit zur Harnkonzentrierung und zur Urinansäuerung sind eher Folgen der Nephrokalzinose [Rodriguez-Soriano et al., 1987]. Seltener wird über klonische Zeichen einer schweren Hypomagnesiämie wie z.B. cerebrale Krampfanfälle berichtet. Zusätzlich zur ausgeprägten Hypomagnesiämie zeigen alle Betroffenen eine Hyperkalziurie und eine bilaterale Nephrokalzinose, wobei der Grad der Nephrokalzinose in frühen Beschreibungen mit der Einschränkung der Nierenfunktion korreliert werden konnte [Rodriguez-Soriano et al., 1987; Praga et al., 1995]. Therapeutische Versuche zielen auf die Reduktion der Kalziumausscheidung ab, um Nephrokalzinose und Steinbildung zu minimieren. Solche Therapieansätze beinhalten die Gabe von Thiaziddiuretika zusätzlich zur Magnesiumsubstitution. Eine Substitution mit Zitraten (vorwiegend Kaliumzitate) soll die Kalziumablagerungen und damit die Nephrokalzinose verzögern. Eine Korrektur der Hypomagnesiämie gelingt aber trotz hoher Dosen von Magnesiumsalzen nicht. Unter der abnehmenden glomerulären Filtrationsrate (GFR) verschwindet im Verlauf die Hypomagnesiämie bisweilen vollständig.

Zusätzlich fallen erhöhte Serumparathormonwerte bereits früh im Verlauf der Erkrankung unabhängig von der Nierenfunktion auf [Praga et al., 1995; Konrad et al.,

2008]. Extrarenale Manifestationen, insbesondere okuläre Abnormalitäten (schwere Kurzsichtigkeit, Nystagmus oder Chorioretinitis), werden als inkonstante Befunde beschrieben [Evans et al., 1981; Castrillo et al., 1983; Rodriguez-Soriano et al., 1987; Praga et al., 1995; Ulmann et al., 1985; Heras et al., 1987; Torralbo et al., 1995], wobei am häufigsten Kurzsichtigkeit und Kolobome Erwähnung finden. Selten wird über eine Hörminderung als extrarenaler Befund berichtet [Evans et al., 1981; Benigno et al., 2000].

Praga et al. beschrieben eine erhöhte Rate von Hyperkalziurie (42%) und Nierensteinen (15%) in der Familienanamnese bei ansonsten gesunden Familienangehörigen [Praga et al., 1995]. Zunächst wurde spekuliert, dass es sich bei isolierter Hyperkalziurie um einen milden Phänotyp der Erkrankung bei einem autosomal dominanten Erbgang mit unterschiedlicher Phänotypausprägung handeln könnte. Bei einem autosomal rezessiven Vererbungsmodus, der durch die Mutationsanalyse bestätigt wird, stellt sich die Frage, ob es sich bei den Familienangehörigen mit Hyperkalziurie und Nierensteinen um symptomatische Merkmalsträger handelt - ein Phänomen, das für autosomal rezessive Erkrankungen eher ungewöhnlich ist. Die Arbeitsgruppe um Praga fand bei keinem Familienangehörigen eine Nephrokalzinose, eine chronische Niereninsuffizienz oder eine profunde Hypomagnesiämie. Selten lag eine milde Hypomagnesiämie vor. Bei zwei Familienangehörigen zeigte das i.v.-Urogramm Zeichen einer Markschwammniere. Über eine Assoziation zwischen Markschwammnieren und FHHNC wurde ebenso bei zwei Brüdern berichtet [Ulmann et al., 1985]. Eine erbliche Komponente bei Patienten mit Markschwammnieren konnte bisher nicht gezeigt werden. Aber Patienten mit Markschwammnieren haben häufig eine Hyperkalziurie und eine Nephrolithiasis, sodass eine Koinzidenz von FHHNC und Markschwammnieren denkbar ist.

Der Defekt scheint durch eine Nierentransplantation kuriert zu werden, da Transplantierte in Verlaufsbeobachtungen normale Serummagnesiumspiegel und eine normale renale Kalzium- und Magnesiumausscheidung zeigten [Praga et al., 1995]. Die Autoren folgerten daher bereits, dass der Defekt auf die Niere beschränkt sein muss. Auch nach Lebendspende einer Niere eines Elternteiles kam es nicht wieder zum Auftreten der Erkrankung [Nicholson et al., 1995], was für den autosomal rezessiven Erbgang spricht, da ja beide Elternteile obligat heterozygot für die Erkrankung sind.

Klinische Beobachtungen und Clearance-Studien bei Patienten mit FHHNC deuten auf eine verminderte Reabsorption von Magnesium und Kalzium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) hin [Rodriguez-Soriano et al., 1987]. Der TAL spielt

eine überragende Rolle bei der renalen Reabsorption von divalenten Kationen, welche in diesem Nephronsegment hauptsächlich passiv über den parazellulären Weg reabsorbiert werden [Quamme, 1997]. Rodriguez-Soriano et al konnten bei Patienten mit FHHNC nachweisen, dass bei kontinuierlicher Magnesiuminfusion die Magnesiumreabsorption unabhängig von der Menge des filtrierten Magnesiums deutlich gestört ist, was auf eine gleichzeitige Herabsetzung von renaler Schwelle und Transportmaximum für Magnesium hinweist. Daher lässt sich der Defekt im TAL vermuten, wo das meiste Magnesium rückresorbiert wird. Aufgrund der vorhandenen Hyperkalziurie und Hypermagnesiurie scheint der Defekt sich auf einen gemeinsamen Transportweg von Magnesium und Kalzium zu beziehen und der Transportweg für Natrium und Chlorid scheint im Gegensatz zum klassischen Bartter-Syndrom nicht betroffen. Eine Verbindung zwischen Kalzium- und Magnesiumreabsorption im TAL wurde bereits demonstriert [Shafik und Green, 1987]. Zusätzlich korrelierte die Ausscheidung von Kalzium und Magnesium im Urin bei Gesunden [Sutton und Watson, 1969] und bei Patienten mit idiopathischer Hyperkalziurie [Martinez et al., 1985]. Die Magnesiumreabsorption im TAL findet nur im kortikalen Segment (cTAL) statt, während im medullären Teil (mTAL) kein Magnesiumtransport beobachtet wird [Mandon et al., 1993]. Die Reabsorption von Magnesium im cTAL ist passiv und parazellulär; sie folgt einem luminal positiven transepithelialem elektrochemischen Gradienten [Shareghi und Agus, 1982; di Stefano et al., 1993; de Rouffignac und Quamme, 1994].

1.2.2 Mutationen im CLDN16-Gen als ursächlicher genetischer Defekt der FHHNC-Erkrankung

Mutationen im PCLN1-Gen auf Chromosom 3q27, welches für das renale Tight Junction Protein Paracellin-1 kodiert, konnten bei FHHNC-Patienten als zugrunde liegender genetischer Defekt identifiziert werden [Simon et al., 1999]. Paracellin-1 ist ein Mitglied der multigenen Claudin-Familie¹ und wird heute als Claudin-16 (CLDN16) bezeichnet. In einem Kollektiv, bestehend aus zehn verschiedenen FHHNC-Familien, konnten Simon et al. zehn verschiedene Mutationen in der Gensequenz nachweisen. In der Mehrzahl handelte es sich dabei um Punktmutationen, von denen einige Mutationen Aminosäuren in besonders stark konservierten Regionen aller Mitglieder der Claudin-

¹ Von lateinisch *claudere* schließen

Familie betreffen, sodass es sich um funktionell wichtige Aminosäurepositionen zu handeln scheint.

Mutationsanalysen von acht Familien (F1-F8) des in dieser Arbeit vorgestellten Patientenkollektives wurden bereits 2000 publiziert [Weber et al., 2000]. Es konnten acht verschiedene Mutationen im CLDN16-Gen identifiziert werden und im Vergleich zur Arbeitsgruppe von Simon et al. ergaben sich sechs neue Mutationen.

In **Abbildung 1.1** ist die genomische Organisation von CLDN16 dargestellt. Das Gen besteht aus 5 Exons [Simon et al., 1999].

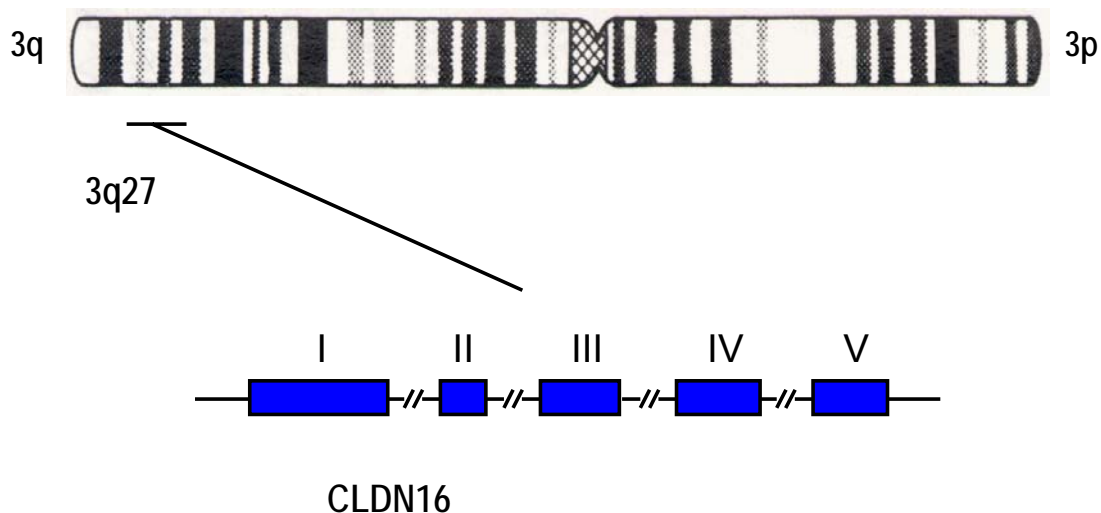


Abbildung 1.1 Genomische Organisation von Claudin-16. Claudin-16 ist in 5 Exons (Exon I bis V) unterteilt (dargestellt als blaue Rechtecke).

Northernblot-(RNA)-Analysen von Claudin-16 zeigten, dass es sich um ein 3.5-kb Transkript handelt, welches ausschließlich in der Niere zu finden ist [Simon et al., 1999]. Claudin-16 wird im medullären und kortikalen dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (mTAL und cTAL) und im distalen gewundenen Tubulus (DCT) exprimiert und zeigt eine Kolokalisation mit Occludin im Bereich von Tight Junctions [Simon et al., 1999].

Mitglieder der Claudin-Familie sind an der Bildung von Tight Junctions in vielen verschiedenen Geweben beteiligt [Morita et al., 1999]. Tight Junctions befinden sich zwischen polarisierten Epithel- und Endothelzellen und bilden eine primäre Barriere für parazellulären Transport von Flüssigkeiten, außerdem beschränken sie die laterale Diffusion von Proteinen und Membranlipiden. Als eines der ersten spezifischen integralen Membranproteine und Komponenten der Tight Junctions wurde Occludin identifiziert [Furuse et al., 1993]. Im Folgenden konnten Claudin-1 und -2, zwei strukturähnliche Proteine, identifiziert und für beide eine Kolokalisation mit Occludin

gezeigt werden [Furuse et al., 1998]. Weitere integrale Membranproteine mit großer Homologie zu Claudin-1 und -2 wurden entsprechend Claudin-3, -4, usw. genannt [Morita et al., 1999; Rahner et al., 2001]. Alle Mitglieder der Claudin-Familie besitzen vier transmembrane Domänen und einen intrazytoplasmatischen NH₂- und COOH-Terminus. Sequenzvergleiche innerhalb der Claudine-Familie zeigen, dass die Aminosäuresequenz der ersten und vierten transmembranen Domäne und der ersten und zweiten extrazelluläre Schleife nahezu konserviert sind [Morita et al., 1999]. Die Aminosäuresequenz von Claudin-16 zeigt eine etwa 10-18%-ige Identität mit einzelnen Claudinen mit der größten Homologie im Bereich der ersten extrazellulären Schleife, die den interzellulären Raum zu überbrücken scheint [Simon et al., 1999]. Claudine zeigen eine spezifische Gewebeverteilung [Morita et al., 1999], wobei Claudin-16 exklusiv in der Niere exprimiert wird [Simon et al., 1999].

CLDN16 besitzt wie alle Claudine einen intrazellulären NH₂- und COOH-Terminus und vier transmembrane Domänen (**Abbildung 1.2**). Zunächst wurde angenommen, dass CLDN16 für ein 305 Aminosäuren langes Protein kodiert [Simon et al., 1999] und das Protein einen zytoplasmatischen NH₂-Terminus von 73 Aminosäurenlänge besitzt, während der intrazelluläre NH₂-Terminus anderer Claudine nur 6 bis 7 Aminosäuren lang ist. Bei Claudin-16 findet sich aber ein zweites Methionin (an Position 71) mit einer passenden Kozak-Konsensussequenz [Kozak, 1996] an einer Position analog zum Startbeginn anderer Claudine [Simon et al., 1999]. Auch fehlen bei allen homologen Proteinen (von Maus, Kuh, etc.) die ersten 70 Aminosäuren, sodass heute angenommen wird, dass Methionin 71 das wahre Startcodon ist.

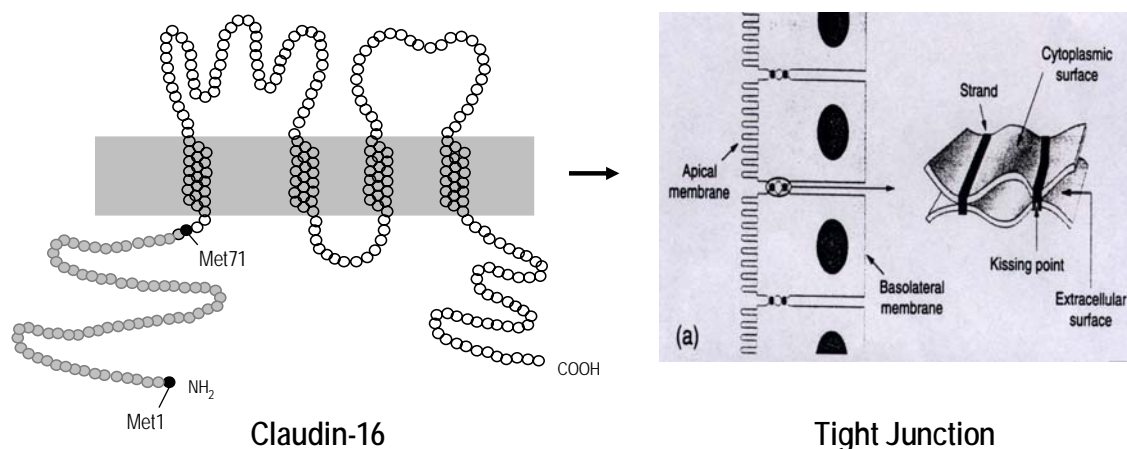


Abbildung 1.2 Proteinmodell von Claudin-16. Claudin-16 besitzt vier transmembrane Domänen, sowie einen intrazellulären NH₂- und COOH-Terminus und zwei extrazelluläre Schleifen, die in den interzellulären Raum ragen (Aminosäurereste abgebildet als Kreise, die Lipidschicht der Zellmembran ist grau dargestellt). Methionin 1 und 71 sind markiert (Met1 und Met71, schwarze Kreise). Die ersten 70 Aminosäuren sind grau unterlegt, da heute angenommen wird, dass Methionin 71 das wahre Startcodon ist.

```

1  ATGACCTCCAGGACCCCACTGTTGGTTACAGCCTGTTTGTATTAT
   M  T  S  R  T  P  L  L  V  T  A  C  L  Y  Y
46 TCTTACTGCAACTCAAGACACCTGCAGCAGGGCGTGAGAAAAAGT
   S  Y  C  N  S  R  H  L  Q  Q  G  V  R  K  S
91 AAAAGACCAGTATTTTCACATTGCCAGGTACCAGAAACACAGAAG
   K  R  P  V  F  S  H  C  Q  V  P  E  T  Q  K
136 ACTGACACCCGCCACTTAAGTGGGGCCAGGGCTGGTGTCTGCCCA
   T  D  T  R  H  L  S  G  A  R  A  G  V  C  P
181 TGTTCATCCTGATGGGCTGCTTGCCACAATGAGGGATCTTCTT
   C  C  H  P  D  G  L  L  A  T  M  R  D  L  L
226 CAATACATCGCTTGCTTCTTTGCCTTTTTTCTCTGCTGGGTTTTTG
   Q  Y  I  A  C  F  F  A  F  F  S  A  G  F  L
271 ATTGTGGCCACCTGGACTGACTGTTGGATGGTGAATGCTGATGAC
   I  V  A  T  W  T  D  C  W  M  V  N  A  D  D
316 TCTCTGGAGGTGAGCACAAAATGCCGAGGCCTCTGGTGGGAATGC
   S  L  E  V  S  T  K  C  R  G  L  W  W  E  C
361 GTCACAAATGCTTTTGTGATGGGATTTCGCACCTGTGATGAGTACGAT
   V  T  N  A  F  D  G  I  R  T  C  D  E  Y  D
406 TCCATACTTGCGGAGCATCCCTTGAAGCTGGTGGTAACTCGAGCG
   S  I  L  A  E  H  P  L  K  L  V  V  T  R  A
451 TTGATGATTACTGCAGATATTCTAGCTGGGTTTGGATTTCTCACC
   L  M  I  T  A  D  I  L  A  G  F  G  F  L  T
496 CTGCTCCTTGGTCTTGACTGCGTGAAATTCCTCCCTGATGAGCCG
   L  L  L  G  L  D  C  V  K  F  L  P  D  E  P
541 TACATTAAAGTCCGCATCTGCTTTGTTGCTGGAGCCACGTTACTA
   Y  I  K  V  R  I  C  F  V  A  G  A  T  L  L
586 ATAGCAGGTACCCAGGAATCATTGGCTCTGTGTGGTATGCTGTT
   I  A  G  T  P  G  I  I  G  S  V  W  Y  A  V
631 GATGTGTATGTGGAACGTTCTACTTTGGTTTTGCACAATATATTT
   D  V  Y  V  E  R  S  T  L  V  L  H  N  I  F
676 CTTGGTATCCAATATAAATTTGGTTGGTCCTGTTGGCTCGGAATG
   L  G  I  Q  Y  K  F  G  W  S  C  W  L  G  M
721 GCTGGGTCTCTGGGTTGCTTTTTGGCTGGAGCTGTTCTCACCTGC
   A  G  S  L  G  C  F  L  A  G  A  V  L  T  C
766 TGCTTATATCTTTTTAAAGATGTTGGACCTGAGAGAACTATCCT
   C  L  Y  L  F  K  D  V  G  P  E  R  N  Y  P
811 TATTCCTTGAGGAAAGCCTATTCAGCCGCGGGTGTTCATGGCC
   Y  S  L  R  K  A  Y  S  A  A  G  V  S  M  A
856 AAGTCATACTCAGCCCCTCGCACAGAGACGCCAAAATGTATGCT
   K  S  Y  S  A  P  R  T  E  T  A  K  M  Y  A
901 GTAGACACAAGGGTGTA 918
   V  D  T  R  V  *

```

Abbildung 1.3 mRNA und Aminosäuresequenz von Claudin-16. Die obere Zeile zeigt die jeweiligen Codons und in der Zeile darunter findet sich die jeweils kodierte Aminosäure. Exon 1: Nukleotid 1-324, Exon 2 : Nukleotid 325-427, Exon 3 : Nukleotid 428-593, Exon 4 : Nukleotid 593- 784, Exon 5 : Nukleotid 785-918. Die jeweiligen Codons und die ersten 70 Aminosäuren sind grau markiert. (Accession Nr.: NM006580)

1.3 Klinische Einteilung der monogenen Magnesiumverlusterkrankungen

Ein angeborener renaler Magnesiumverlust wurde erstmals von Freeman und Pearson 1966 durch den Begriff „Magnesium-losing kidney“ geprägt [Freeman und Pearson, 1966]. Allerdings erfolgte keine Differenzierung und der Begriff fasste verschiedene erbliche Entitäten mit renalem Magnesiumverlust zu einem klinischen Syndrom zusammen. Erstmals Rodriguez-Soriano propagierte die Einteilung in verschiedene kongenitale Magnesiumverlusterkrankungen [Rodriguez-Soriano et al., 1987] und beschrieb drei zu differenzierende Erkrankungen, die wir heute als FHHNC, Gitelman-Syndrom und isolierte dominante Hypomagnesiämie (primäre Hypomagnesiämie) kennen.

Die FHHNC-Erkrankung muss also in eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die mit einer gestörten Magnesiumhomöostase einhergehen, eingeordnet und von anderen Formen der familiären Hypomagnesiämie differenziert werden. Da die Magnesiumhomöostase in engen Bereichen aufrechterhalten und über intestinale Resorption und renale Ausscheidung gesteuert wird, kann Magnesiummangel durch reduzierte Aufnahme, intestinale Malabsorption und renalen Verlust entstehen. In die Gruppe monogener Magnesiumverlusterkrankungen gehören somit nicht nur hereditäre Tubulopathien mit Magnesiumverlust, sondern auch angeborene Erkrankungen mit Störung der intestinalen Magnesiumaufnahme. Die klinische Charakterisierung von Erkrankten in unterschiedliche Phänotypen ist wichtig zur Differenzierung angeborener Magnesiumverlusterkrankungen. Das Vorhandensein zusätzlicher Elektrolytstörungen, Veränderung des Säure-Basen-Haushalts sowie die Unterscheidung zwischen Störungen der intestinalen Aufnahme und renalen Ausscheidung von Magnesium trägt zur Einteilung in verschiedene Subtypen bei. Bezüglich renaler Magnesiumverlusterkrankungen kann durch Identifizierung des jeweils betroffenen Nephronsegmentes weiter differenziert werden [Cole und Quamme, 2000]. In den letzten Jahren konnte eine Anzahl von Genen, die an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind, identifiziert werden. Dadurch wird es möglich, die unterschiedlichen erblichen Erkrankungen in verschiedene Subtypen zu klassifizieren [Konrad und Weber, 2003]. Im Folgenden sollen kurz die einzelnen monogenen Magnesiumverlusterkrankungen phänotypisch charakterisiert werden und, wenn bekannt, den jeweiligen genetischen Defekten zugeordnet werden.

1.3.1 Primäre Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie

Die primäre Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie (HSH) zeigt im Vergleich mit der FHHNC eine sehr ausgeprägte Hypomagnesiämie ($\sim 0,2$ mmol/l) und eine zusätzliche Hypokalziämie ($\sim 1,6$ mmol/l). Andere Elektrolytstörungen, Nephrokalzinose oder Nephrolithiasis finden sich nicht. Sie wurde erstmals von Paunier 1968 beschrieben [Paunier et al., 1968]. Die Erkrankung manifestiert sich sehr früh, in der Regel im Alter von 4-5 Wochen, mit generalisierten Krämpfen, die im Verlauf zu einer psychomotorischen Retardierung führen können. Im Gegensatz zu anderen hereditären Magnesiumverlusterkrankungen lokalisierten pathophysiologische Studien mit radioaktiv markiertem Magnesiumisotopen bei Erkrankten den primären Defekt in der intestinalen Magnesiumaufnahme [Lombeck et al., 1975; Milla et al., 1979]. Eine zusätzliche renale Komponente konnte bei HSH-Patienten nach Magnesiumbelastung nachgewiesen werden [Walder et al., 2002], sodass HSH-Patienten trotz Hypomagnesiämie Magnesium über die Niere verlieren [Schlingmann et al., 2002]. Walder et al. gelang die Lokalisation des verantwortlichen Genortes auf Chromosom 9q12-9q22.2 und konnten so den autosomalen Erbgang bestätigen [Walder et al., 1997]. Als zugrunde liegender genetischer Defekt konnten Mutationen im „*transient receptor potential (melastatin) 6*“-(*TRPM6*)-Gen identifiziert werden, welches für TRPM6 kodiert, ein Mitglied der „transient receptor potential“-(*TRP*)-Familie von Kationenkanälen [Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002]. TRPM6 wird im gesamten gastrointestinalen Trakt und in der Niere exprimiert. In der Niere findet sich TRPM6 ausschließlich in der apikalen Membran von Tubulusepithelzellen im DCT [Voets et al., 2004]. TRPM6 zeigt eine große Homologie zu TRPM7, beschrieben als Kalzium- und Magnesium durchlässiger Ionenkanal, der über Magnesium-ATP reguliert wird [Nadler et al., 2001]. TRPM6 ist der apikale Magnesiumkanal über den Magnesium in die DCT-Zelle aus dem Tubuluslumen aufgenommen wird.

1.3.2 Isolierte Hypomagnesiämie, autosomal dominant und rezessiv

Die isolierte dominante Hypomagnesiämie (primäre Hypomagnesiämie, autosomal dominant) wurde erstmals 1987 von Geven et al. beschrieben [Geven et al., Kidney Int., 1987]. Erkrankte zeigen nur eine milde Hypomagnesiämie und im Gegensatz zur FHHNC eine Hypokalziurie. Einige Patienten werden erst im Erwachsenenalter symptomatisch, andere zeigen im Säuglingsalter generalisierte Krämpfe mit Folgen einer schweren mentalen Retardierung. Familienmitglieder zeigen ebenso eine

Hypomagnesiämie passend zu einem autosomal dominanten Vererbungsmodus. Der genetische Defekt konnte auf Chromosom 11q23 lokalisiert [Meij et al., 1999] und das verantwortliche Gen *FXRD* identifiziert werden [Meij et al., 2000]. Es kodiert für die γ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase, die an der basolateralen Zellmembran im DCT lokalisiert ist, wo der Magnesiumtransport aktiv und transzellulär ist. Die γ -Untereinheit moduliert die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, welche wichtig für die Erhaltung des Membranpotentials und des Natriumgradienten ist. Es ist bisher unbekannt, welcher molekulare Mechanismus zur Hypomagnesiämie und Hypokalziurie bei Patienten mit Mutationen im *FXRD*-Gen führt. Es wird vermutet, dass die fehlende Modulation der Na^+/K^+ -ATPase durch die γ -Untereinheit zu Veränderungen der elektrochemischen Gradienten von Natrium und Kalium führt und sekundär über den apikalen TRPM6-Kanal Magnesium vermindert reabsorbiert wird [Hoenderop und Bindels, 2005].

Bei der isolierten rezessiven Hypomagnesiämie (primäre Hypomagnesiämie, autosomal rezessiv) konnte die Hypomagnesiämie ebenso auf eine renale Störung mit erhöhter Magnesiumausscheidung zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur autosomal dominanten Erkrankung zeigen die Patienten schon früh im Säuglingsalter Symptome der Hypomagnesiämie, und es fehlt die für die dominante Form typische Hypokalziurie [Geven et al., Clin Genet., 1987]. Eine Mutation im „*epithelial growth factor*“-(*EGF*)-Gen, das für pro-EGF kodiert, konnte als krankheitsverursachend identifiziert werden [Groenestege et al., 2007]. Pro-EGF wird in der luminalen und basolateralen Membran des DCT exprimiert und wird durch extrazelluläre Proteasen in aktiven EGF gespalten. Durch Bindung an den basolateral exprimierten EGF-Rezeptor (EGFR) im DCT aktiviert EGF den apikalen Magnesiumkanal, TRPM6, und führt so zur vermehrten Rückresorption von Magnesium. Die Mutation im pro-EGF-Gen führt zu einer verminderten Expression von pro-EGF in der basolateralen Membran und so zu einer reduzierten extrazellulären EGF-Produktion und folglich zur reduzierten Stimulation des basolateral gelegenen EGFR.

1.3.3 Erkrankungen mit Defekten des $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -sensing-Rezeptor

Zu den Erkrankungen mit Defektem im $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -sensing-Rezeptor (CaSR) gehören die familiäre hypokalziurische Hyperkalziämie (FHH) und der neonatale schwere Hyperparathyreodismus (NSHPT) sowie der autosomal dominante Hypoparathyreodismus (ADH). Ursächlich sind für alle 3 Erkrankungen Mutationen im *CaSR*-Gen. CaSR gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Hebert, 1996].

Der extrazelluläre CaSR spielt eine wichtige Rolle in der Magnesium- und Kalziumhomöostase nicht nur durch Beeinflussung der PTH-Sekretion, sondern auch durch direkte Regulation der Magnesium- und Kalziumresorptionsrate in der Niere. CaSR wird nicht nur in PTH-sezernierenden Zellen der Epithelkörperchen exprimiert, sondern auch entlang des Nephrons hauptsächlich im TAL [Bapty et al., 1998]. In der Niere führt die Aktivierung von CaSR zur geminderten Reabsorption von divalenten Kationen im TAL und geminderter Wasserreabsorption in den Sammelrohren [Brown und MacLeod, 2001].

Es konnten sowohl aktivierende als auch inaktivierende Mutationen des CaSR beschrieben und entsprechenden klinischen Erscheinungsbildern zugeordnet werden. FHH und NSHPT resultieren aus inaktivierenden CaSR-Mutationen, wobei heterozygote Mutationen mit FHH assoziiert sind und homozygote bzw. compound heterozygote mit NSHPT [Pollack et al., 1993; Pollack et al., J Clin Invest., 1994]. Patienten mit FHH, auch familiäre benigne Hyperkalziämie genannt, zeigen eine milde Hypermagnesiämie und milde Hyperkalziämie, die selten von Symptomen begleitet wird und nur manchmal eine Behandlung erfordert [Marx et al., 1981]. Die Ausscheidung von Magnesium und Kalzium im Urin ist deutlich reduziert und das Serum-PTH ist inadäquat erhöht. Patienten mit NSHPT werden schon in der frühen Neonatalperiode symptomatisch mit ausgeprägter Polyurie und Dehydration aufgrund der schweren Hyperkalziämie. Die Ausscheidung von Kalzium und Magnesium im Urin ist deutlich vermindert bei hoher Reabsorptionsrate [Pollack et al., 1993; Pollack et al., J Clin Invest., 1994]. Hyperkalziämie und Hyperparathyreodismus führen unbehandelt zu schweren Skelettdeformationen mit Knochendemineralisierung, extraossären Kalzifikationen, Muskelschwäche, Hypotonie und Ateminsuffizienz des Neugeborenen sowie schwersten neurologischen Schäden. Eine frühe Therapie mit partieller oder totaler Parathyreoidektomie ist daher entscheidend für den Verlauf der Erkrankung [Cole et al., 1997]. Ohne Entfernung der hyperplastischen Epithelkörperchen ist der Verlauf in der Regel letal [Pollack et al., J Clin Invest., 1994].

Der beiden Erkrankungen zugrunde liegende Pathomechanismus ist durch eine Verschiebung der Empfindlichkeit des CaSR-Rezeptors zu erklären. Im Fall von inaktivierenden Mutationen kommt es zu einer reduzierten Sensitivität, sodass bei selbst normwertigen Kalzium- bzw. Magnesiumspiegeln einem vermeintlichen Mangel dieser Kationen mit einer erhöhten Reabsorption begegnet wird. Die Schwere der Erkrankung

hängt davon ab, ob ein elterliches Allel oder beide betroffen sind (Gen-Dosis-Effekt) [Pollack et al., J Clin Invest., 1994].

ADH zeigt wie die FHHNC eine Hypomagnesiämie mit erhöhter renaler Ausscheidung von Magnesium und Kalzium. Im Gegensatz zur FHHNC liegt eine milde bis deutliche Hypokalziämie mit den typischen Symptomen vor. Nephrokalzinose kommt gehäuft bei Therapie mit Vitamin D und Kalzium vor [Pearce et al., 1996]. Häufig werden die Patienten aufgrund des niedrigen PTH-Spiegels bei Hypokalziämie fälschlich als primärer Hypoparathyreodismus diagnostiziert.

Bei ADH werden aktivierende Mutationen im *CaSR*-Gen gefunden [Pollak et al., Nat Genet., 1994]. Aktivierende Mutationen führen zu einer veränderten Empfindlichkeit des Rezeptors im Sinne einer erhöhten Sensitivität. Die inadäquate Aktivierung des CaSR führt bei physiologischen extrazellulärem Kalzium- und Magnesiumspiegeln zu verminderter PTH-Sekretion und verminderter Reabsorption beider divalenter Kationen hauptsächlich im cTAL. Im Fall von Magnesium könnte die zusätzliche verminderte hormonstimulierende Aufnahme im DCT komplizierend zur verminderten Aufnahme im TAL hinzukommen und so zu einem ausgeprägtem renalem Magnesiumverlust führen [Dai et al., 2001].

1.3.4 Salzverlust-Tubulopathien, Bartter-ähnliche Syndrome

Eine Gruppe von hereditären Tubulopathien mit mehr oder weniger ausgeprägtem Magnesiumverlust bilden die hypokaliämischen Salzverlusttubulopathien. Hierzu gehören das Hyperprostaglandin-E-Syndrom/antenatales Bartter-Syndrom mit oder ohne Taubheit (HPS/aBS), das klassische Bartter-Syndrom (cBS) und das Gitelman-Syndrom (GS). Diese Gruppe besteht aus klinisch und genetisch unterschiedlichen Störungen, denen die Symptome renaler Salzverlust, hypokaliämische metabolische Alkalose, erhöhte Plasmarenin- und Aldosteronspiegel bei normotonom Blutdruck gemeinsam sind. Die verschiedenen zusätzlichen Veränderungen im Kalzium- und Magnesiumhaushalt helfen, diese heterogene Gruppe in verschiedenen klinische Phänotypen zu unterteilen, und liefern Hinweise auf das betroffene Nephronsegment.

Die Gitelman-Variante (GS) des Bartter-Syndroms wurde von Gitelman et al. erstmals beschrieben [Gitelman et al., 1966]. Klinisch zeigt sich neben der Hypokaliämie und der metabolischen Alkalose eine Hypomagnesiämie und im Gegensatz zur FHHNC eine Hypokalziurie. Betroffene manifestieren sich in der Kindheit oder Jugend mit Muskelschwäche oder Tetanien aufgrund der ausgeprägten Hypomagnesiämie,

Müdigkeit und Gelenksbeschwerden aufgrund von Chondrokalzinose. Als Ursache konnten Mutationen im *SLC12A3*-Gen, das für den Na^+/Cl^- -Kotransporter (NCCT) kodiert, nachgewiesen werden [Simon et al., Nat Genet., 1996 Jan.].

Das Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS/aBS) wird durch Mutationen entweder im Furosemid-sensiblen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter Typ 2 (NKCC2) im *SLC12A1*-Gen oder im Kaliumkanal (ROMK) im *KCNJ1*-Gen hervorgerufen, die bei der apikalen Aufnahme von NaCl im TAL kooperieren [Simon et al., Nat Genet., 1996 Jun.; Simon et al., Nat Genet. 1996 Oct.; International Collaborative Study Group for Bartter like Syndroms, 1997]. Die Betroffenen zeigen eine ausgeprägte Polyurie, die sich bereits in utero mit einem Polyhydramnion manifestiert und zu Frühgeburtlichkeit führt. Postnatal zeigt sich ein massiver Salzverlust und eine nachfolgende hypokaliämische metabolische Alkalose mit zusätzlicher Hyperkalziurie und Nephrokalzinose [Seyberth et al., 1998]. Eine Störung des Magnesiumhaushaltes ist aber eher selten.

Eine Variante des HPS/aBS ist mit sensorineuraler Taubheit (SND) assoziiert [Birkenhager et al., 2001] und wurde erstmals von Landau et al. beschrieben [Landau et al., 1995]. Mutationen in einem neuen Gen, genannt Barttin (*BSND*), konnten in dieser Untergruppe identifiziert werden. Barttin konnte funktionell charakterisiert werden als eine aktivierende β -Untereinheit renaler Chloridkanäle ClC-Ka und ClC-Kb [Estevez et al., 2001; Waldegger et al., 2002]. Klinisch zeigen die Patienten einen meist noch stärkeren renalen Salz- und Wasserverlust, aber Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose und eine Hypomagnesiämie sind im Vergleich zu HPS/aBS selten.

Das klassische Bartter-Syndrom (cBS) wird durch Mutationen im *CLCNKB*-Gen, das für den Chlorid-Kanal ClC-Kb kodiert, hervorgerufen [Simon et al., 1997; Konrad et al., 2000]. Die klinische Präsentation der Betroffenen variiert sehr stark mit einem Phänotyp ähnlich dem HPS/aBS oder einem Phänotyp, der kaum von dem des GS zu unterscheiden ist [Jeck et al., 2000; Peters et al., 2002; Zelikovic et al., 2003]. Meist zeigen die Betroffenen, wie ursprünglich von Bartter et al. berichtet, Hypokaliämie, Hypochlorämie und Wachstumsverzögerung innerhalb der ersten zwei Lebensjahre [Bartter et al., 1962]. Pränataler Beginn und Nephrokalzinose wie in HPS/aBS sind ungewöhnlich. Bei ca. 50% der Fälle besteht eine Hypomagnesiämie, die Kalziumausscheidung ist variabel, aber eine Hypokalziurie ist nicht selten zu finden [Konrad et al., 2000; Peters et al., 2002].

1.4 Magnesiumstoffwechsel

Magnesium spielt eine wesentliche Rolle in diversen biologischen Systemen und ist für viele Funktionen des Körpers unerlässlich [Altura, 1991]. Eine weitere wichtige Rolle liegt bei der Modulation von Membrantransportern und der Signaltransduktion. Als ein Kofaktor und intrazellulärer Aktivator vieler enzymatischer Reaktionen spielt Magnesium eine Schlüsselrolle in vielen wichtigen biologischen Prozessen wie z.B. zellulärer Energiegewinnung, Proteinsynthese und Zellreplikation. Auch die Membran gebundene Na^+/K^+ -ATPase ist in ihrer Funktion abhängig von Magnesium [Hexum et al., 1970].

1.4.1 Physiologische Grundlagen der Magnesiumhomöostase

Magnesium ist das vierthäufigste Kation im Körper und intrazellulär das zweithäufigste Kation bzw. häufigste divalente Kation. Intrazellulär sind abhängig von Zelltyp nur etwa 0,5-5% des Magnesiums frei und ionisiert (etwa 0,5 mmol/l) [Quamme und Rabkin, 1990]. Der Rest ist an Anionen gebunden wie ATP (ca. 80%), ADP, Ziträt, Proteine, DNA und RNA oder befindet sich in Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum [Tsien, 1983]. Die intrazelluläre Konzentration wird in einem sehr engen Bereich konstant gehalten [de Rouffignac und Quamme, 1994].

Da Magnesium ein intrazelluläres Ion ist, repräsentiert das Serummagnesium den Körpermagnesiumgehalt nicht optimal. Der Körpermagnesiumgehalt liegt bei etwa 24 g (1000 mmol). Die Serummagnesiumkonzentration wird unter physiologischen Bedingungen in einem engen Bereich konstant gehalten und steht im Gleichgewicht und ständigem Austausch mit den Magnesiumspeichern von Knochen, Niere, Darm und anderen Geweben. Im Knochen, dem größten Magnesiumreservoir des Körpers, befinden sich 60% des gesamten Körpermagnesiums. Etwa die Hälfte davon kann am Austausch mit dem extrazellulären Magnesium teilnehmen. Weitere 39% des Körpermagnesiums finden sich in anderen Geweben, vorwiegend im Skelettmuskel (50%). Weniger als 1% befindet sich extrazellulär im Blut [Elin, 1994]. Etwa 25% des Serummagnesiums sind an Proteine gebunden und 75% finden sich in Komplexen oder als freies Magnesiumion [Altura und Altura, 1994]. Ionisiertes (etwa 65%) und in Komplexen gebundenes (etwa 10%) Magnesium bilden die ultrafiltrierbare Fraktion, aber die biologisch aktive Form ist das freie ionisierte Magnesium. **Abbildung 1.4** gibt die Verteilung von Magnesium im Körper wieder.

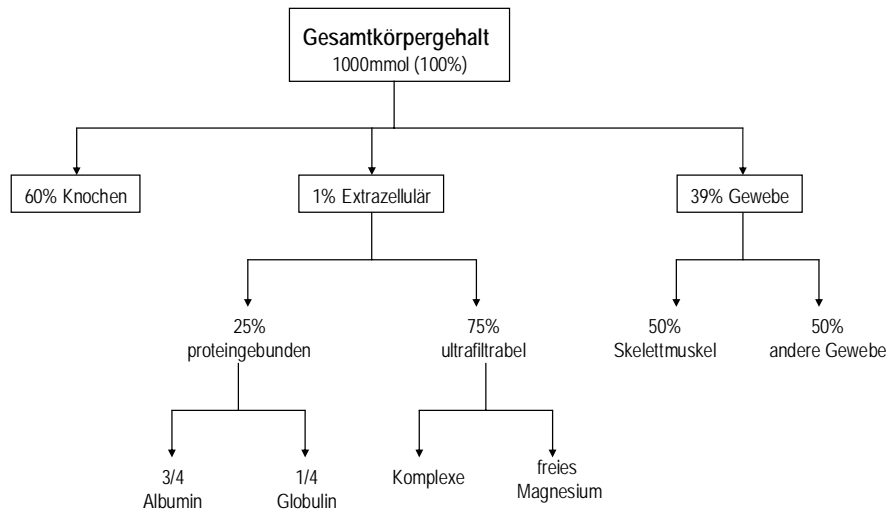


Abbildung 1. 4 Magnesiumverteilung im Körper.

1.4.2 Intestinale Resorption und renale Ausscheidung von Magnesium

Die Magnesiumhomöostase wird in engen Bereichen aufrechterhalten und über die Magnesiumresorption im Darm und die renale Magnesiumausscheidung gesteuert. Magnesiummangel kann aus reduzierter Aufnahme, intestinaler Malabsorption oder renalem Verlust resultieren. Die eigentliche Kontrolle der Magnesiumhomöostase erfolgt aber durch die Niere.

Von den täglich mit der Nahrung aufgenommenen etwa 12 mmol werden 6 mmol intestinal resorbiert und 2 mmol intestinal sezerniert. In der Niere werden 84 mmol täglich filtriert und etwa 80 mmol wieder reabsorbiert und somit 4 mmol renal ausgeschieden (**Abbildung 1.5**). Das mit der Nahrung aufgenommene Magnesium wird hauptsächlich im Dünndarm und nur zu einem geringen Anteil im Dickdarm resorbiert [Nordin, 1976].

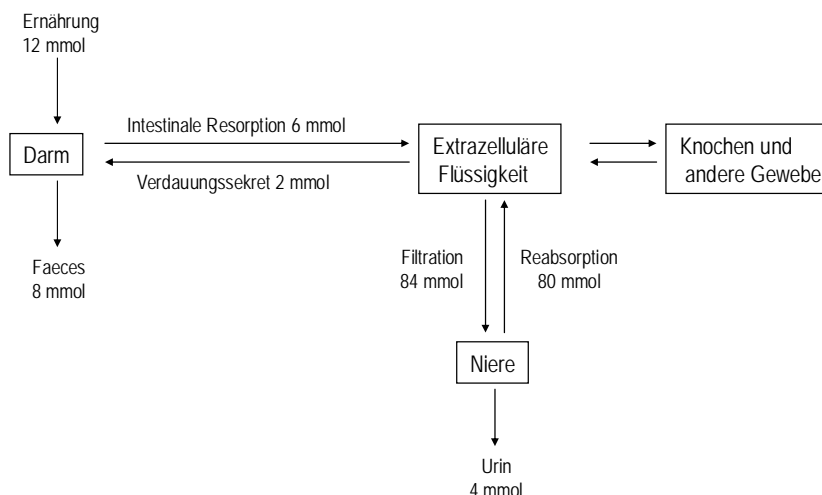


Abbildung 1.5 Magnesium-Umsatz.

Die intestinale Magnesiumresorption erfolgt über zwei verschiedene Wege: einem aktiven transzellulären Weg mit Sättigungsmaximum und einem passivem parazellulärem ohne Sättigungskinetik [Kerstan und Quamme, 2002]. Das transzelluläre Transportsystem zeigt eine limitierte aktive Transportkapazität. Bei niedrigen intraluminalen Magnesiumkonzentrationen wird Magnesium primär über den aktiven transzellulären Weg transportiert und mit steigenden Konzentrationen über den parazellulären Weg, sodass eine Kurvenfunktion für die gesamte Resorption entsteht [Konrad und Weber, 2003; Schlingmann et al., 2004]. Die Aufnahme von Magnesium und Kalzium scheint auf getrenntem Wege zu erfolgen [Karch und Feldmeier, 1991]. Die aktive transzelluläre Magnesiumresorption aus dem Darmlumen erfolgt apikal über TRPM6-Kanäle in die Epithelzelle [Voets et al., 2004]. Der basolaterale Schritt ist unbekannt. Möglicherweise erfolgt basolateral der Magnesiumausstrom im Austausch mit Natrium in einem sekundär aktiven Prozess.

Bei Mangelzuständen können die intestinale Aufnahme und ebenso die Rückresorption aus dem Primärharn der Niere kompensatorisch gesteigert werden. Diese Transportprozesse werden metabolisch und hormonell reguliert [Kerstan und Quamme, 2002; Quamme und de Rouffignac, 2000]. Die Kontrolle der Magnesiumhomöostase und Aufrechterhaltung der Magnesiumkonzentration im Serum obliegt aber im Prinzip den Nephronen der Niere. Die Kompensationsfähigkeit der Niere reicht von kompletter Magnesiumkonservierung ohne Magnesiumausscheidung im Urin bei Magnesiummangel bis zu nahezu kompletter Ausscheidung des filtrierten Magnesiums bei Magnesiumüberschuss.

Unter normalen Bedingungen werden etwa 80% des Plasmamagnesiums im Glomerulum filtriert [Le Grumellec et al., 1973]. Davon werden wieder mehr als 95% entlang des Nephrons rückresorbiert. Im proximalen Tubulus werden nur etwa 15-20% Magnesium reabsorbiert, während Kalzium und Natrium hier zu etwa 65-75% bereits reabsorbiert werden [Quamme u. de Rouffignac, 2000]. Die geringe Reabsorptionsrate für Magnesium im proximalen Tubulus ist einzigartig für den renalen Ionentransport. Alle anderen bisher untersuchten Ionen werden zu einem weit größeren Teil bereits in diesem Segment reabsorbiert. Allerdings werden beim Neugeborenen bis zu 70% des filtrierten Magnesiums im proximalen Tubulus reabsorbiert, ähnlich wie bei Natrium und Kalzium. Die Permeabilität des proximalen Tubulus ändert sich also im Verlauf der Entwicklung mit einer reduzierten Aufnahme im Erwachsenenalter [Lelièvre-Pegorier et al. 1983]. Der Grund für die erhöhte Magnesiumaufnahme im unreifen Nephron scheint

in der mangelnden Reifung der parazellulären Barriere zu liegen, sodass große Mengen von Magnesium mit Natrium, Kalzium und Wasser über den parazellulären Weg mitgerissen werden.

Der Magnesiumtransport scheint im proximalen Tubulus überwiegend passiver Natur und ohne ein Sättigungsmaximum zu sein, abhängig von der Natrium- bzw. Wasser-Reabsorption und der luminalen Magnesiumkonzentration [de Rouffignac und Quamme, 1994]. Die Mechanismen der Magnesiumreabsorption im proximalen Tubulus sind noch unbekannt, aber die Aufnahme scheint transzellulär zu sein [Quamme, 1997].

Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird der größte Teil des Ultrafiltrates reabsorbiert. Während im medullären dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (mTAL) keine Reabsorption von Magnesium stattfindet, wird der Hauptanteil mit etwa 70% des Ultrafiltrates im kortikalen dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (cTAL) reabsorbiert [Mandon et al., 1993]. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass in diesem Teil die Reabsorption parazellulär und passiv ist [Shareghi und Agus, 1982; di Stefano et al., 1993; de Rouffignac und Quamme, 1994], einem luminal positiven elektrochemischen transepithelialen Gradienten folgend. Die lumenpositive Potenzialdifferenz in der Henle-Schleife wird bestimmt durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Kotransporter und die aktive Natriumrückresorption. Störungen dieser transzellulären Salzreabsorption verändern demnach die transepitheliale Potenzialdifferenz und damit indirekt die parazelluläre Rückresorption von Magnesium (und auch Kalzium). Eine andere Möglichkeit, die Magnesiumreabsorption zu beeinflussen, liegt in der Änderung der parazellulären Permeabilität. Dies würde eine Änderung elektrostatischer Ladungen von Proteinen, die am Aufbau des parazellulären Weges beteiligt sind, bedeuten [Quamme und de Rouffignac, 2000]. Im Bereich der Henle-Schleife ist Claudin-16 maßgeblich an dem Aufbau von Tight Junctions beteiligt und erscheint verantwortlich für die parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Kalzium im cTAL [Simon et al., 1999]. **Abbildung 1.6 A** zeigt schematisch die Reabsorptionsprozesse in einer TAL-Zelle.

Von den etwa 5-10% des Ultrafiltrates, die die weiter distal der Henle-Schleife gelegenen Segmente erreichen, werden 70-80% im distalen Konvolut reabsorbiert. Es gibt keine Hinweise auf eine nennenswerte Reabsorption nach dem distalen gewundenen Tubulus (DCT), sodass dieser wichtig für die endgültige Ausscheidung von Magnesium im Urin ist [Quamme und de Rouffignac, 2000]. Die

Magnesiumreabsorption im DCT ist transzellulär und aktiv [Dai et al., 2001]. Die Magnesiumaufnahme in die DCT-Zelle ist spezifisch und wird nicht mit Kalzium geteilt [Quamme, 1997]. Die postulierten Magnesiumtransportprozesse im DCT ähneln aber denen von Kalzium. Für die luminale Kalziumaufnahme sind Dihydropyridin sensitive Ca^{2+} -Kanäle beschrieben, die durch Hyperpolarisation aktiviert werden [Hoenderop et al., 1999]. Die Magnesiumaufnahme über die apikale Membran in die DCT-Zelle erfolgt passiv und durch spezifische und regulierte Magnesiumkanäle entlang des negativen transmembranen elektrischen Potentials [Dai et al., 2001]. Der apikale Magnesiumkanal ist das erst kürzlich charakterisierte TRPM6. TRPM6 kodiert für ein neues Mitglied der „transient receptor potential (melastatin)“- (TRP)-Familie für Kationenkanäle [Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002] und ist der ursächliche genetische Defekt bei Patienten mit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie (HSH). Das TRPM6-Protein ist sehr homolog zum TRPM7-Protein, welches als ein Kalzium und Magnesium durchlässiger Kanal charakterisiert wurde [Nadler et al., 2001]. TRPM6 wird im Gastrointestinaltrakt exprimiert und in der Niere ausschließlich in DCT-Zellen [Voets et al., 2004]. Die Aufnahme in die DCT-Zelle könnte der limitierende Schritt sein und damit die Stelle, an der Regulationsmechanismen greifen. An der basolateralen Membran muss Magnesium ins Interstitium entgegen einem elektrochemischen Konzentrationsgradienten ausgeschleust werden. Der Mechanismus dieses Vorganges ist parallel zum Gastrointestinaltrakt noch unbekannt. Möglicherweise erfolgt der Magnesiumausstrom durch einen natriumabhängigen Austausch [Quamme, 1997]. **Abbildung 1.6 B** zeigt schematisch eine Zelle des DCT.

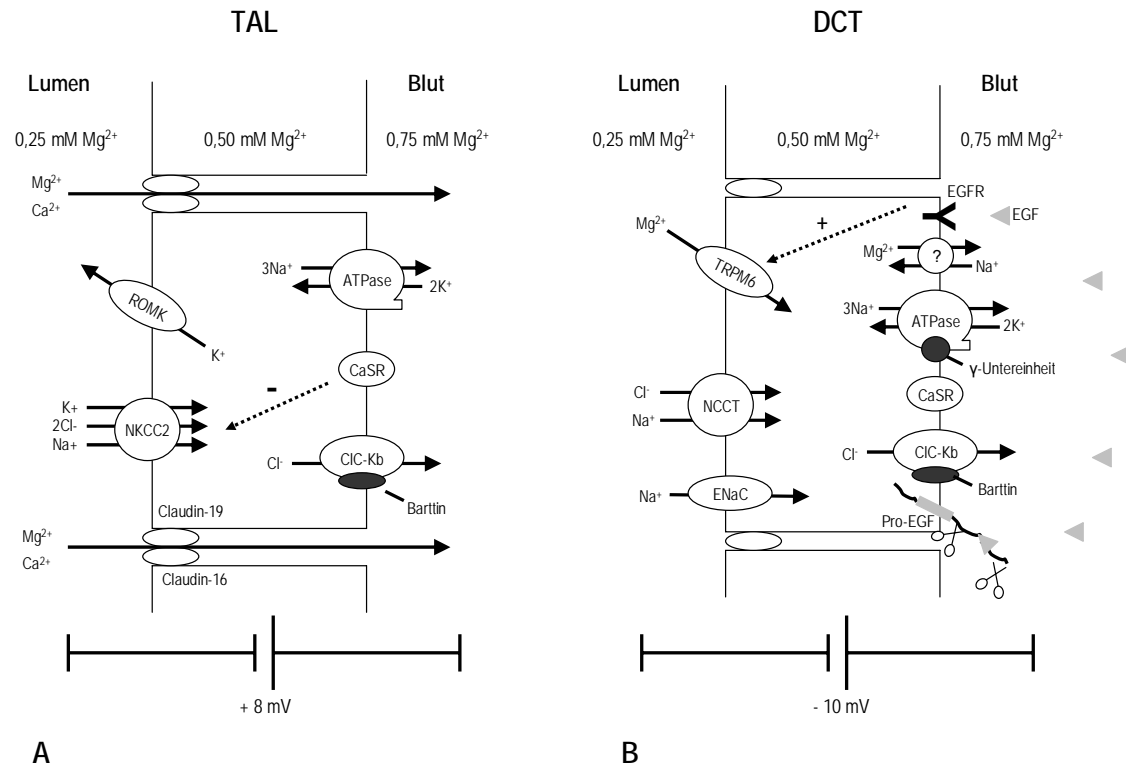


Abbildung 1.6 A Magnesiumreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL). Die parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Kalzium folgt der lumenpositiven transzellulären Spannung. Diese wird durch die aktive transzelluläre Reabsorption von NaCl generiert. NaCl wird apikal über den $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$ -Kotransporter Typ 2 (NKCC2) in die Zelle aufgenommen. Na^{+} verlässt die Zelle basolateral über die Na^{+}/K^{+} -ATPase und Cl^{-} über den Chlorid-Kanal (CIC-Kb), während K^{+} wieder zurück ins Lumen über den Kalium-Kanal (ROMK) recycelt wird. $CaSR$ inhibiert diesen Prozess und verhindert so die parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Kalzium.

B Magnesiumreabsorption im distalen gewundenen Tubulus (DCT). Hier wird Magnesium aktiv über den transzellulären Weg reabsorbiert. Der apikale Schritt in die Zelle hinein erfolgt über Magnesiumionenkanäle (TRPM6). Basolateral könnte der Ausstrom von Magnesium durch einen Natrium-gekoppelten Austauschmechanismus vermittelt werden. Die molekulare Grundlage des basolateralen Austausches ist unbekannt. [Konrad und Weber, 2003]. In der basolateralen Membran findet sich pro-EGF, welcher durch extrazelluläre Proteasen in EGF (epithelial growth factor) gespalten wird. EGF bindet an den EGF-Rezeptor (EGFR) und aktiviert so TRPM6 [Alexander et al., 2008].

Nur etwa 5% des filtrierten Magnesiums werden renal ausgeschieden. Es gibt keinerlei Hinweise auf eine signifikante Sekretion von Magnesium, sodass die Regulation der Magnesiumausscheidung und damit der Magnesiumhomöostase alleine über die Reabsorptionsrate stattfindet. **Abbildung 1.7** zeigt schematisch die segmentalen Transportvorgänge entlang eines Nephrons.

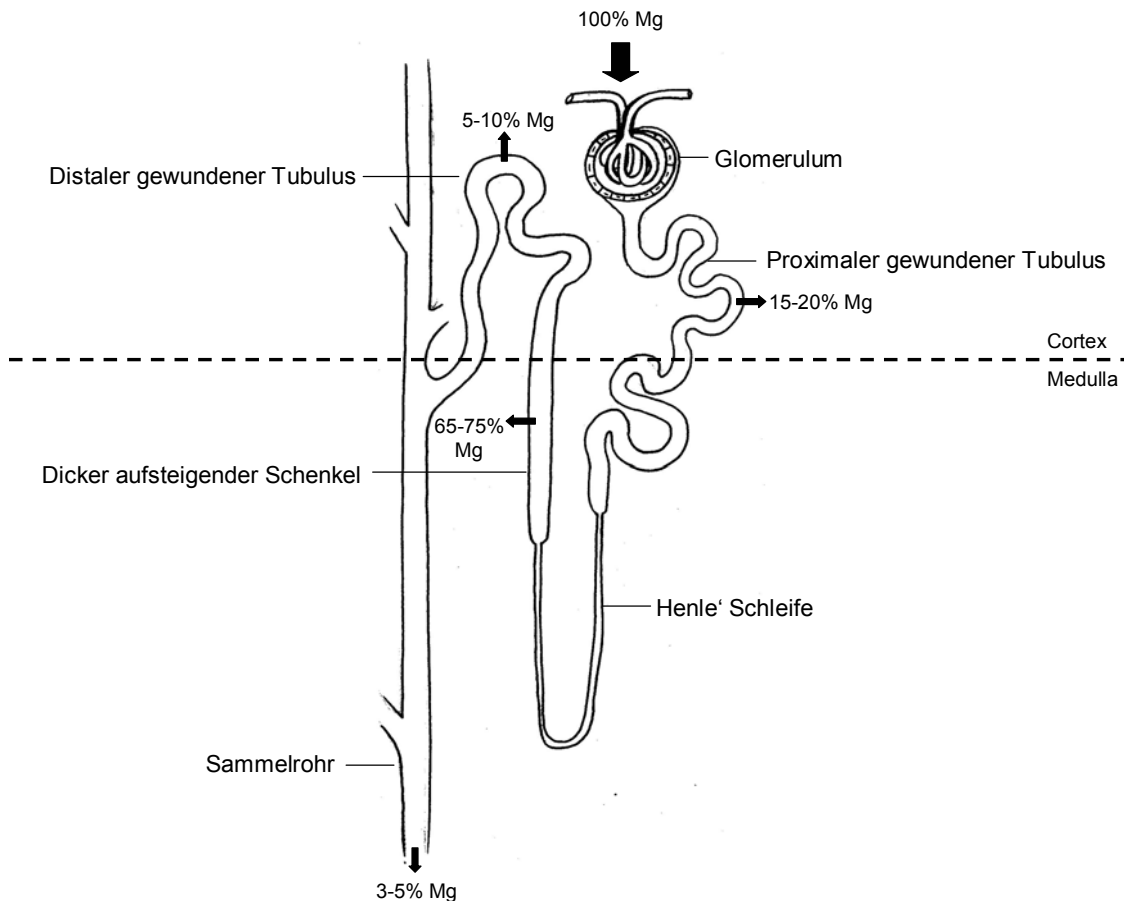


Abbildung 1.7 Die segmentalen Magnesiumtransportvorgänge entlang des Nephron.

1.5 Hypomagnesiämie im klinischen Alltag

1.5.1 Ursachen einer Hypomagnesiämie

Erbliche Störungen der Magnesiumhomöostase stellen nur einen kleinen Teil der Ursachen eines Magnesiummangels dar. Nichterbliche Ursachen können primäre Ernährungsstörungen wie z. B. inadäquate Magnesiumaufnahme oder eine total parenterale Ernährung sein. Weiterhin gibt es gastrointestinale Störungen wie verschiedene Malabsorptions-Syndrome (z.B. intestinale Lymphome, Morbus Whipple, Zöliakie, Darmfisteln, chronische Pankreasinsuffizienz, Kurzdarmsyndrom, biliodigestive Anastomosen). Intestinaler Magnesiumverlust kann auch bei chronischer Diarrhoe oder Pankreatitis auftreten. Auch endokrine Störungen (z.B. wie Hyperparathyreodismus, Hypoparathyreodismus, Hyperthyreose, primärer Hyperaldosteronismus, diabetische Ketoazidose, alkoholische Ketoazidose) führen zu Magnesiummangel. Ebenso kann über eine zelluläre Umverteilung wie bei „Hungry bone Syndrom“ nach Parathyreodektomie oder bei chronischem Alkoholismus ein

Magnesiummangel entstehen. Renale Magnesiumverluste können bei Gabe verschiedener Medikamente (z.B. Diuretika, Cisplatin, Aminoglykoside, Calcineurin-Inhibitoren, Amphotericin B, Capreomycin, Viomycin, Pentamidin, Theophyllintoxizität oder bei der Therapie mit Coloniestimulierenden Faktoren) entstehen. Auch bei Ethanol-Vergiftungen oder in der Erholungsphase nach akuter tubulärer Nekrose kann Magnesiummangel auftreten.

1.5.2 Symptome einer Hypomagnesiämie

Die Diagnose eines Magnesiummangels ist nicht einfach. Oft sind Patienten asymptomatisch oder die Symptome sind unspezifisch und/oder kompliziert durch andere Elektrolytverschiebungen, besonders Kalium oder Kalzium. Magnesiummangel ist z.B. häufig mit Kaliummangel verbunden, da Ursachen wie Diuretika oder Diarrhoe einen Mangel von beidem verursachen. Bei einer leichten Hypomagnesiämie ($<0,65$ mmol/l) treten selten Symptome auf. Erst bei Werten kleiner $<0,50$ mmol/l zeigen sich erste Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, Bauchschmerzen, Lethargie und Schwäche. Bei schwerem Magnesiummangel bestehen Zeichen der erhöhten neuromuskulären Erregbarkeit wie Tremor, Muskelkrämpfe, Tetanien und generalisierte Krämpfe, Aufmerksamkeitsstörungen oder auch Verwirrtheit. Kardiale Manifestationen sind Vorhof- oder Kammertachykardien, vorzeitige Kontraktionen, ein verlängertes QT-Intervall und Torsade-de-Pointes-Tachykardien.

1.5.3 Diagnostische Schwierigkeiten eines Magnesiummangels

Während andere Elektrolyte wie Kalium, Natrium, Kalzium, Chlorid häufig bereits routinemäßig im Blut bestimmt werden, wird Magnesium nur bei bestimmten Fragestellungen angefordert. Wie oben bereits diskutiert, macht die rein klinische Diagnose einer Hypomagnesiämie Schwierigkeiten. Zudem entwickelt sich eine Hypomagnesiämie erst spät bei Magnesiummangel und intrazellulär verarmen die Zellen trotz normalen Serummagnesiumwerten.

Da Magnesium ein intrazelluläres Ion ist, repräsentiert das Serummagnesium den Körpermagnesiumgehalt nur unzureichend [Elin et al., 1994]. Es gibt bisher immer noch keine validen Methoden zur Bestimmung des Körper- bzw. Gewebemagnesiums, sodass subklinische Formen eines Magnesiummangels oft unerkannt bleiben. Eine gute Alternative zur Magnesiumbestimmung im Serum gibt es aber nicht. Normalwerte sind für Serummagnesium immer wieder diskutiert worden, ein anerkannter

Referenzwertbereich liegt bei 0.70–1.10 mmol/l. Der Serummagnesiumspiegel ist altersabhängig, und es ergeben sich unterschiedliche Referenzbereiche für Kinder und Erwachsene [Geven et al., 1993; Rodriguez-Soriano et al., 1987]

Die Messung des ionisierten Serum- oder des intrazellulären Magnesium (z.B. in Blutzellen) zur Evaluation des Magnesiumstatus hat sich nicht als Vorteil erwiesen. Die Ergebnisse korrelierten nicht gut mit den Ergebnissen des Magnesiumbelastungstestes. MRT-Untersuchungen sind zwar eine neue Methode für nicht-invasive Messung von Körpermagnesium, aber nicht praktikabel zur Routinemessung.

Die Niere reagiert sensibel auf einen Magnesiummangel, sodass die Magnesiumausscheidung im Urin sich für die Bestimmung des Körpermagnesiums eignet. Zudem kann bei unklarer Hypomagnesiämie zwischen renalen und extrarenalen Verlusten unterschieden werden. Im Rahmen eines Magnesiummangels liegt die Magnesiumausscheidung in 24 Stunden unter 1 mmol [Sutton, 1993]. Nur bedingt geeignet aufgrund von intra- und interindividueller Variabilität sind Magnesium/Kreatinin-Quotienten und die fraktionierte Magnesiumausscheidung zur Diagnose eines Magnesiummangels [Elisaf, 1997].

Der Goldstandard zur Bestimmung des Körpermagnesium bleibt nach wie vor der parenterale Magnesiumbelastungstest (magnesium loading test = MLT) mit eingeschränkter Aussagefähigkeit bei Niereninsuffizienz [Elin, 1994]. Mit der Formel $1 - (\text{Mg}^{2+} \text{ im 24 Stunden Urin } \text{Mg}^{2+} \text{ Testdosis}) \times 100$ kann die Retention der intravenösen Magnesiumladung abgeschätzt werden. Zur Testdurchführung gibt man 1 mmol elementares Magnesium pro kg Körpergewicht über 4 Stunden intravenös und bestimmt die Magnesiumausscheidung im 24 Stunden Sammelurin [Ryzen et al., 1985]. Ein Magnesiummangel liegt vor bei Ausscheidung von weniger als 70% des infundierten Magnesiums. Neben der Bedeutung in der Erkennung eines Magnesiummangels bei Patienten mit normalem Serummagnesium und mit normalem renalen Magnesiumstoffwechsel erlaubt der parenterale MLT eine Unterscheidung zwischen renalem und extrarenalem Magnesiumverlust bei Patienten mit angeborenen Formen eines Magnesiumverlustes.

1.5.4 Therapie eines Magnesiummangels

Ein Problem in der Therapie eines Magnesiummangels stellen die Nebenwirkungen (schwere Diarrhoen) unter oraler Substitution dar, sodass häufig eine Normalisierung des Serummagnesiums nicht erreicht wird. Primäres Ziel ist aber nicht die

Normalisierung des Magnesiumspiegels, sondern die Kontrolle der Symptome. Es gibt verschiedene Magnesiumsalze, die sich in ihrer Löslichkeit, intestinalen Resorption und den Nebenwirkungen unterscheiden. Magnesiumzitrat oder –aspartat eignen sich besser zur oralen Therapie und haben weniger abführende Wirkungen [Ranade und Somberg, 2001]. Neben der oralen ist eine intravenöse oder eine intramuskuläre Therapie möglich, wobei intramuskuläre Injektionen schmerzhaft sind. Bei kleinen Kindern kann über eine nächtliche nasogastrale Dauerinfusion Magnesium zugeführt werden. Bei einer schweren symptomatischen Hypomagnesiämie mit zentralnervösen Symptomen erfolgt die Substitution intravenös [Agus, 1999], wobei Vorsicht bei Niereninsuffizienz geboten ist. Wichtig ist dabei die Kontrolle von Blutdruck, Herzfrequenz, Atmung und Serummagnesium. Als Antidot kann Kalziumgluconat (intravenös) gegeben werden.

1.6 Fragestellung

Ziel der Arbeit war die klinische Charakterisierung der Patienten mit FHHNC sowie die Identifizierung der Mutationen im CLDN16-Gen. Durch Gegenüberstellung von Phänotyp und Genotyp sollte eine Korrelation zwischen bestimmten Genmutationen und ihrem klinischen Verlauf überprüft werden.

Mit einer Familienuntersuchung wurde der Frage nach symptomatischen heterozygoten Merkmalsträgern nachgegangen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Wie und wann manifestiert sich die Erkrankung? Welche Symptome und laborchemischen Veränderungen zeigen die Betroffenen bei Diagnosestellung? Wie sieht der klinische Verlauf aus und wie entwickelt sich die Nierenfunktion im Verlauf der Erkrankung?
2. Korrelieren Symptome und klinischer Verlauf mit bestimmten Genmutationen? Zeigen bestimmte Mutationen einen prognostisch ungünstigen Verlauf mit z.B. frühzeitigem Erreichen einer Dialysepflichtigkeit? Lassen sich damit Rückschlüsse auf für die Funktion des Genproduktes besonders wichtige Stellen im Proteinaufbau treffen? Kann so das Verständnis für Funktion und Aufbau von Molekülen, die an der Regulation des parazellulären Transportes beteiligt sind, vertieft werden?
3. Zeigen heterozygote Merkmalsträger im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv laborchemische Veränderungen und werden diese vermehrt symptomatisch mit z.B. einer Nephrolithiasis?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Familien

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit umfasst 25 Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft mit 33 betroffenen Individuen, die in 12 verschiedenen europäischen Zentren betreut werden. Das Kollektiv entstand im Rahmen der Kollaboration der Universitäts-Kinderklinik Marburg mit anderen europäischen medizinischen Zentren zur Untersuchung der genetischen Grundlagen der FHHNC.

Die diagnostischen Kriterien aller in die Studie einbezogenen Patienten gründeten auf folgendem klinischen Symptomenkomplex: Hypomagnesiämie, Hyperkalziurie, bilaterale Nephrokalzinose und das Fehlen von hypokaliämischer metabolischer Alkalose. Eine Hypomagnesiämie wurde definiert bei wiederholtem Serummagnesiumspiegel $<0,65$ mmol/l (Grenzwert für Kinder ab 6 Monaten) [Geven et al., 1993]. Um eine Hyperkalziurie diagnostisch zu sichern, wurden entweder die Kalziumausscheidung im Urin in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht im 24-Stunden-Sammelurin oder die Kalzium/Kreatinin-Quotienten im Urin bestimmt. Eine Hyperkalziurie wurde bei einer Kalziumausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin >4 mg/kg bei Kindern älter als 2 Jahre festgelegt [Moxey-Mims u. Stapleton, 1993]. Die für diese Studie geforderten altersabhängigen oberen Grenzwerte für Kalzium/Kreatinin- bzw. Magnesium/Kreatinin-Quotienten basierten auf der Evaluation von Matos et al. [Matos et al., 1997] und Geven et al. [Geven et al., 1993].

Die bereits genetisch charakterisierten Patienten dienten als Grundlage der vorliegenden Arbeit zur Phänotypisierung der Patienten und zur Evaluierung einer eventuellen Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Die erhobenen Familiendaten wurden zur Charakterisierung von heterozygoten Merkmalsträgern herangezogen, nachdem eine genetische Charakterisierung erfolgt war.

Von allen Patienten und den untersuchten Familienangehörigen wurde vor Beginn der Studie die Einverständnis zur Teilnahme eingeholt.

2.1.1 Phänotypisierung der Patienten

Um die Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu evaluieren, sollten genetische Daten mit spezifischen klinischen Aspekten ergänzt werden. Zur weiteren Phänotypisierung der Patienten und der Familienuntersuchung diene ein standardisierter und detaillierter Fragebogen, der Krankengeschichte, Familienanamnese, Laboruntersuchungen und klinische Aspekte erfragt (siehe Originalfragebogen im Anhang).

Der Fragebogen gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Abschnitt umfasst allgemeine Informationen (Geschlecht des Patienten, Konsanguinität und ethnische Herkunft der Familie). In Abschnitt 2 werden zur Evaluation der Kardinalsymptome der Erkrankung umfassende Laboruntersuchungen und klinische Daten der Patienten ermittelt. Im Besonderen interessierten die nachfolgend aufgeführten Parameter:

- 1) klinischer Symptomenkomplex aus Hypomagnesiämie, Hypermagnesiurie, Hyperkalziurie, Nephrokalzinose und aktuelle Nierenfunktion
- 2) Laboruntersuchungen im Serum: Magnesium, Kalzium, Kalium
- 3) Laboruntersuchungen im Urin: Magnesium- und Kalziumausscheidung (vorzugsweise in Kreatinin-Quotienten)
- 4) Säure-Basen-Haushalt in Relation zur Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Messung
- 5) Konzentrationsfähigkeit der Niere
- 6) Polyurie/Polydipsie
- 7) Nephrolithiasis
- 8) Harnwegsinfekte
- 9) Ansäuerungsfähigkeit der Nieren: Durchführung eines Säurebelastungstests; Vorliegen einer inkompletten distal-renal-tubulären Azidose
- 10) Hypozitraturie
- 11) Muskeltetanien
- 12) zerebrale Krampfanfälle
- 13) Bauchschmerzepisoden
- 14) Augenmanifestationen:
 - Nystagmus
 - Kolobome
 - Myopie
 - andere Augenmanifestationen

- 15) Hyperparathyreodismus; Angabe des PTH-Wertes und der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Messung
 - 16) Hyperurikämie
 - 17) zusätzliche Angaben zu Hormonen wie Renin und Aldosteron im Serum, zu Vitamin D Metaboliten und Prostaglandinen im Urin
 - 18) Resultate von eventuell erfolgten Nierenbiopsien
 - 19) weitere zuvor nicht erwähnte Symptome
- Zu allen Punkten soll das Datum der Messung/Diagnosestellung/Symptombeginn in Klammern angeführt werden.

Abschnitt 3 umfasst detaillierte Informationen zur Funktionsfähigkeit der Nieren. Ein Teil A erfragt, inwiefern schon eine Reduktion der renalen glomerulären Filtrationsrate (GFR) eingetreten ist: Beginn von chronischer Niereninsuffizienz, Dialyse oder Transplantation sollen dokumentiert werden. Um einen Verlauf der Nierenfunktion über den Zeitraum der Beobachtung zu erhalten, wird im Teil B die Kreatinin-Clearance in ml/min/1,73 m^2 in Bezug zum Alter der Patienten in einem Diagramm erfasst. Alternativ zur Kreatinin-Clearance kann auch der Serum-Kreatininwert und die Körpergröße der Patienten in das Diagramm eingetragen werden, sodass daraus mit der Formel von Schwartz et al. [Schwartz et al., 1987] eine Annäherung an die Kreatinin-Clearance errechnet werden kann.

Frühe Patientendaten wurden aus medizinischen Patientenakten gesammelt und von den verantwortlichen Pädiatern in dem zuvor beschriebenen Fragebogen und/oder persönlich bestätigt. In einigen Fällen konnten durch persönliche Kontaktaufnahme mit Patienten Daten zur Vorgeschichte der Erkrankung und Familienanamnese erhoben werden. Aktuelle Daten, die die Nierenfunktion und die Ergebnisse der Familienuntersuchung betreffen, stellten ebenfalls die jeweilig verantwortlichen pädiatrischen Zentren zur Verfügung.

Die Laboruntersuchungen im Serum und Urin wurden mit Standardtechniken analysiert. Die GFR wurde bei 30 Patienten aus Serum-Kreatinin und Körpergröße mit der Formel von Schwartz et al. [Schwartz et al., 1987] berechnet und in ihrem Verlauf dokumentiert. Eine chronische Niereninsuffizienz wurde bei einer GFR von $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ definiert.

Festgehalten wurden Manifestationsalter der Erkrankung und die initiale klinische Präsentation in Form von Manifestationssymptomen. Das Auftreten und Fortbestehen von klinischen und biochemischen Befunden, die für die FHHNC-Erkrankung typisch sind, wurden dokumentiert (Polydipsie und Polyurie, Harnwegsinfekte, Nierensteine, extrarenale Manifestationen). Befunde von bildgebenden Verfahren wie Nierensonographie, Röntgen- und CT-Aufnahmen sowie die Ergebnisse von erfolgten Nierenbiopsien wurden beschrieben.

2.1.2 Familienuntersuchung

Zur Untersuchung der Familienmitglieder wurde dem Fragebogen ein Abschnitt 4 beigelegt, der im Teil A anamnestisch folgende Parameter erfasst:

- 1) bekannte Hyperkalziurie und/oder
- 2) Nierensteinleiden in der (auch weiter entfernten) Familie
- 3) positive Familienanamnese für häufige Harnwegsinfekte und/oder
- 4) Markschwammniere (MSK)
- 5) andere stattgehabte und/oder chronische Nierenerkrankungen

Teil B befasst sich mit der Untersuchung erstgradiger Verwandter zur Abklärung einer Hyperkalziurie und/oder Nephrokalzinose zur Evaluation von Symptomen in heterozygoten CLDN16-Mutationsträgern. Zur Detektion einer Nephrokalzinose soll eine Nierensonographie von den jeweils verantwortlichen medizinischen Zentren veranlasst und das entsprechende Ergebnis dokumentiert werden. Die Kalziumausscheidung im Urin wird durch die jeweiligen Kalzium-Kreatinin-Quotienten im Urin erfasst und eine Hyperkalziurie bei Erwachsenen als Kalzium-Kreatinin-Quotient im Urin $>0,6$ mmol/mmol definiert (mind. zweimal).

Im Teil C sollen minimales Serum-Magnesium, Kreatinin-Clearance (respektive Serum-Kreatinin und Körpergröße zur Annäherung der GFR nach der Formel von Schwartz et al. [Schwartz et al., 1987]) und Magnesium-Ausscheidung im Urin (ausgedrückt in Magnesium-Kreatinin-Quotienten) notiert werden.

Die für die Familienuntersuchung geforderten altersabhängigen oberen Grenzwerte für Kalzium-Kreatinin- bzw. Magnesium-Kreatinin-Quotienten basierten ebenso auf der Evaluation von Matos et al. [Matos et al., 1997] und Geven et al. [Geven et al., 1993].

Zunächst wurden alle erstgradig Verwandten der Patienten, d.h. Eltern und Geschwister, in die Studie einbezogen. In einem zweiten Schritt folgten weiter entfernt Verwandte, soweit sie für die klinischen Untersuchungen zur Verfügung standen.

Die Familienuntersuchung schloss eine genetische Charakterisierung des für die FHHNC-Erkrankung verantwortlichen CLDN16-Genabschnitts mit ein. Ein Screening auf CLDN16-Mutationen erfolgte mit SSCP (single-strand conformation polymorphism) Analyse. Um mittels PCR die kodierende CLDN16-Sequenz (Exon 1-5) aus genomischer DNA zu amplifizieren, wurden überlappende Primer verwendet. Amplifizierte Genprodukte wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Exone mit Konformations-Veränderungen wurden direkt sequenziert.

Als Kontrollgruppe für die Mutationsanalysen diente ein Kollektiv von 50 gesunden Personen (entsprechend 100 Chromosomen), das zur Interpretation der im folgenden Text beschriebenen Methoden herangezogen wurde.

Vorgehensweise der genetischen Untersuchung:

Für molekulargenetische Analysen wurde von den Familienangehörigen aus Vollblut DNA extrahiert, damit das CLDN16-Gen auf Mutationen untersucht werden konnte. Die kodierende Region und die Intron-Exon Grenzen wurden auf Varianten in der Basenabfolge überprüft und die Varianten sequenziert.

Zur Untersuchung der CLDN16-Gensequenz wurden zunächst die einzelnen Exone 1 bis 5 mit jeweils überlappenden Primerpaaren mittels PCR amplifiziert und anschließend mittels SSCP-Analyse auf Auffälligkeiten in der DNA-Struktur untersucht. Exon 1 wurde in drei Abschnitte unterteilt und mit jeweils überlappenden Primerpaaren mittels PCR amplifiziert. SSCP-Analysen wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen (15°C und 4°C) durchgeführt. Da die SSCP-Methode bezüglich der Beurteilung eines aberranten Musters ein eher unspezifisches Verfahren darstellt, folgten allen auffälligen SSCP-Analysen eine DNA-Sequenzierung, um so festzustellen, ob eine wirksame Mutation vorliegt. Eine schematische Übersicht über die Vorgehensweise zeigt **Abbildung 2.1**.

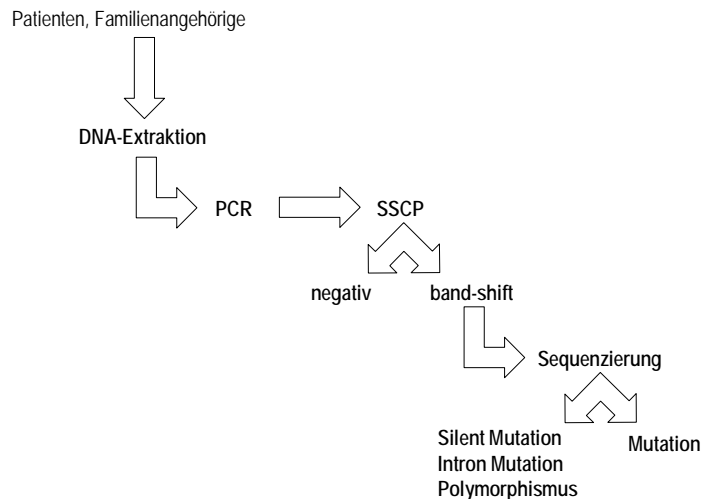


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Detektion von Mutationen im CLDN16-Gen

2.2 Materialien

2.2.0 Allgemeine Materialien

1. Geräte und Hilfsmittel:

Liste der allgemein verwendeten Hilfsmittel und Geräte, auf die im weiteren Text nicht mehr gesondert verwiesen wird:

- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Osterode)
- Kühlzentrifuge Varifuge 3.0 RS (Fa. Heraeus, Osterode)
- Tischzentrifuge (Fa. Qualitron, Korea)
- Vakuumzentrifuge DNAplus (Fa. Heto, Allerød/Dänemark)
- Power Supply-EPS 200 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Power Supply-EPS 600 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Analysenwaage Modell 510 (Fa. Kern, Albstadt)
- Feinwaage Modell R180D (Fa. Sartorius, Göttingen)
- Milli-Q-Water System (Fa. Millipore, Eschborn)
- Vortex Laborrührer VF2 (Fa. Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
- Überkopfdreher Modell REAX2 (Fa. Heidolph, Kelheim)
- pH-Meter Delta 340 (Fa. Mettler, Halstead/England)
- Magnetrührer MR 3001 K (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Mikrowellenofen Modell R-7180 (Fa. Sharp, England)
- Dampfsterilisator HAST 400L (Fa. Zirbus, Bad Grund)

- Fotodokumentationssystem Bio-Print V.96 (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- UV-Flächenstrahler TFX (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- Plattformschwenker (Eigenbau der Werkstatt der Universität Marburg)
- Pipetten und Spitzen (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Abimed, Düsseldorf)
- Pasteurpipetten (Fa. Brand, Wertheim)
- Röhrchen und Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Greiner, Nürtingen)
- Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Dublin/Irland)

2. Chemikalien und Reagenzien:

Die aufgeführten Chemikalien entsprechen alle dem Reinheitsgrad p.A.

- Borsäure Kat. Nr. M202.11 (Fa. GATC, Konstanz)
- Bromphenolblau Na-Salz Kat. Nr. A512.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- DEPC Kat. Nr. D-5758 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Essigsäure 100% Kat. Nr. 1.00063 Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid Kat. Nr. 1.11615 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ficoll 400 Kat. Nr. F-4375 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Na-EDTA Kat. Nr. 03677 (Fa. Fluka Biochemika, Neu-Ulm)
- Natriumhydroxid Kat. Nr. 0402 (Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer/Holland)
- Tris Kat. Nr. 17-1321-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Xylencyanol Kat. Nr. A513.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 100 Base-Pair Ladder Kat. Nr. 27-4001-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC-H₂O
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5 M EDTA, pH 8,0
- TE-Puffer, pH 8,0
- TAE-Puffer, pH 8,0
- TBE-Puffer
- Loading buffer

2.2.1 Materialien für DNA-Extraktion aus Vollblut

1. Geräte:

- Spektral-Photometer GeneQuant II Kat. Nr. 80-2105-98 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)

- Quarzglas-Küvette Kat. Nr. 105.202.008-QS (Fa. Hellma, Müllheim)
2. Chemikalien:
- „Nucleon[®] blood and cell culture (BACC2) genomic extraction & purification kit“ Kat. Nr. RPN 8502 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) beinhaltet:
 - Reagenz A: 10 mM Tris-HCl
320 mM Saccharose
5 mM MgCl₂
1% Triton X-100
pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert
 - Reagenz B: 400 mM Tris-HCl
60 mM EDTA
150 mM NaCl
pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert
 - 5 M Natrium Perchlorats
 - Nucleon[®] Resin Silica-Lösung
 - Ethanol *absolut* Kat. Nr. 32205 (Fa. Riedel-de Haën, Seelze)
 - Chloroform Kat. Nr. 1.02445 (Fa. Merck, Darmstadt)

2.2.2 Materialien für PCR

1. Geräte:
- GeneAmp[®] PCR System 2400 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
 - GeneAmp[®] PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
 - MikroAmp[™] Reaction Tubes Kat. Nr. N801-0540 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
 - MikroAmp[™] Base Kat. Nr. N801-5531 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
 - MikroAmp[™] Tray/Retrainer Assembly Kat. Nr. N801-5530 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
2. Chemikalien:
- Taq DNA Polymerase Kat. Nr. 27-0799 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
 - 10x Reaction Buffer Kat. Nr. 27-0799A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0)
 - Polymerizations Mix Kat. Nr. 27-20994-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) (20mM dNTP)

- Oligonucleotid-Primer (Fa. Life Technologies, Eggenstein)
- DEPC-H₂O

2.2.3 Materialien für Gelelektrophorese

1. Geräte:

- Elektrophoresekammer (Fa. MWG-Biotech)
- Gießform

2. Chemikalien:

- Qualex-Gold-Agarose (Fa. AGS GmbH, Heidelberg)
- Ethidiumbromid
- TAE-Puffer 1x
- 100 Base-pair Ladder-Lösung

2.2.4 Materialien für SSCP

1. Geräte:

- Thermomixer Modell 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Kühlgenerator Multi Temp[®] III Kat. Nr. 18-1102-78 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- ElektrophoresisUnit Multiphor[®] II Kat. Nr. 18-1018-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- GelPool Kat. Nr. 18-1031-58 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- PaperPool Kat. Nr. 18-1031-59 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Metallbecken mit einer Oberfläche aus SIS 2332 Grad Stahl, die nicht die Silberfärbe-Methode stört
- Plattformschwenker

2. Chemikalien:

- CleanGel DNA Analysis Kit Kat. Nr. 17-1198-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet:

CleanGel 48S

Sammelgel (T=5%, C=3%)

Trenngel (T=10%, C=2%)

48 Probenbrunnen

8 µl Ladungskapazität

Größe: 250 x 110 x 0,5 mm (nach Rehydration)

	Gelrückseite aus Polyesterfilm
Gelpuffer	pH 8,45
	0,001% Bromphenolblau
	0,001% Orange G
Elektrodenpuffer	pH 7,9
Papierelektrodenstreifen	5,5 x 25,3 cm
Lagerung bei +4°C bis +8°C	
• Formamid Kat. Nr. 1.09684 (Fa. Merck, Darmstadt)	
• PlusOne™ DNA Silver Staining Kit Kat. Nr. 17-6000-30 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet:	
Fixierlösung, 5x	Benzschwefelsäure
	3,0% w/v in 24% v/v Ethanol
Silbernitratlösung, 5x	Silbernitrat 1,0% w/v
	Benzschwefelsäure 0,35% w/v
Natriumkarbonatlösung, 5x	Natriumkarbonat 12,5 w/v
Formaldehyd; 37%	Formaldehyd; 37% w/v in H ₂ O
Natriumthiosulfat; 2%	Natriumthiosulfat; 2% w/v in H ₂ O
Stop- und Konservierungslösung, 5x	Essigsäure 5% v/v
	Natriumazetat 25% w/v
	Glyzerol 50% v/v
Lagerung bei +10°C bis +30°C, Gebrauch bei +20°C bis +27°C, bei Temperaturen unter +20°C muss die Entwicklungsdauer auf 8-10 Minuten verlängert werden.	

2.2.5 Materialien für DNA-Sequenzierung

1. Geräte:

- Sequenzer ALF[®] express (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Elektrophorese-Set: Heizplatte (Standart), Glasplatte (Standart), Spacer (0,5 mm), Kamm (0,5 mm)
- AM V3.0 Software (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Microspin™ S-300 HR Columns Kat. Nr. 27-5130-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sterilfilter Kat. Nr. 16534 (Fa. Sartorius, Göttingen)

2. Chemikalien:

- Ammoniumpersulfat Kat. Nr. A-3678 Fa. Sigma, Deisenhofen)
- SequaGel-6™ Kat. Nr. 900610 (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf)
 - 6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 19:1
 - 0,1 M tris-Borat
 - 2 mM EDTA, pH 8,3
 - 8,3 M Harnstoff
 - TEMED
- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP Kat. Nr. RPN 2538 (Amersham Life science, Braunschweig) beinhaltet:

Reagenz A	ddATP, Tris-HCL pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Merkaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz C	ddCTP, Tris-HCL pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Merkaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz G	ddGTP, Tris-HCL pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Merkaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Reagenz T	ddTTP, Tris-HCL pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Merkaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
Formamid loading dye	Formamid, EDTA, Methylviolett
- Oligonukleotid-Primer (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC-H₂O
- TBE-Puffer 0,6x

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Nukleinsäuren, insbesondere DNA, sind in der Zelle mit Proteinen assoziiert. Diese Nukleoproteinkomplexe können durch Behandlung mit konzentrierten Salzlösungen in ihre Bestandteile zerlegt werden, eine wichtige Methode zur Isolierung und Reinigung dieser Verbindungen. Durch Messung der UV-Absorption können Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt werden.

5-10 ml EDTA-Blut werden zur Präparation der Zellen benötigt. Um DNA-Schädigungen zu minimieren, sollten bei 4°C aufbewahrte Blutproben innerhalb von 24 Stunden verarbeitet oder bei -80°C tiefgefroren werden. Heparinisiertes oder Zitrat-Blut ist ebenfalls verwendbar. Heparin kann aber bei nachfolgenden Anwendungen stören, da es während der Extraktion DNA binden und ein Störfaktor bei PCR-Techniken sein kann.

Zur Lysierung der Zellen wird das Blut in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 4 Volumenanteilen der Reagenz A versetzt. Das Gemisch wird für 4 Minuten im Überkopfdreher bei Raumtemperatur geschüttelt und danach für weitere 4 Minuten zentrifugiert bei 1300 g und 4°C. Der Überstand (Zytoplasma) wird vorsichtig dekantiert ohne das Pellet (Zellkerne) zu verlieren. Zum Resuspendieren des Pellets werden 2 ml der Reagenz B hinzugefügt und kurz geschüttelt. Reagenz B enthält Natrium-Dodecylsulfat (SDS) zur Denaturierung von Proteinmolekülen und gleicht Ladungen aus. Die Suspension wird nun in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Zur Proteinentfernung fügt man 500 µl Natrium-Perchlorat hinzu und mischt, indem man das Röhrchen wenige Male von Hand umschwenkt. Die eigentliche Extraktion der DNA beginnt mit dem Zufügen von 2 ml Chloroform zur Proteindenaturierung, wobei nun unter dem Abzug gearbeitet wird. Zum Emulgieren der Phasen wird das Röhrchen erneut wenige Male per Hand umgeschwenkt. Nachfolgend werden 300 µl Nucleon® Resin Silica-Lösung zugegeben und, ohne die Phasen erneut zu mischen, zentrifugiert für mindestens 3 Minuten bei 1300 g und 4°C.

Zur DNA-Präzipitation wird die oberste Phase (ungefähr 2,5 ml) vorsichtig in ein sauberes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um Proteinkontamination zu minimieren, sollten Verunreinigung mit der Resin-Schicht bzw. mit der evtl. assoziierten weißen Proteinschicht vermieden werden. Hinzufügen von doppelten Volumenanteilen eiskalten Ethanol *absolut* und leichtes Invertieren des Röhrchens führt

zur DNA-Präzipitation als feines sichtbares weißes Fadenwerk. Die präzipitierte DNA kann an dieser Stelle mit einer hitzesterilisierten Pasteurpipette isoliert und direkt in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen in TE-Puffer gelöst werden. Entsprechend der gewonnenen DNA-Menge benötigt man 100-500 µl TE-Puffer. Respektive kann die DNA mit Ethanol 70% gewaschen werden. Dazu wird bei Höchstgeschwindigkeit (mindestens 4000 g) für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgekippt. Zum DNA-Pellet wird 2 ml kaltes Ethanol 70% hinzugefügt und einige Male invertiert, erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser Schritt kann, falls notwendig, wiederholt werden. Die DNA wird für etwa 10 Minuten luftgetrocknet bis des Ethanol vollständig verdampft ist und anschließend in einer angemessenen Menge TE-Puffer gelöst.

Nach vollständigem Lösen der DNA, am besten über Nacht durch Schwenken in einem Überkopfdreher, wird deren Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 260 nm bestimmt. Die Stammlösung wird mit destilliertem Wasser 1:100 verdünnt. Als Referenzwert, d.h. eine Lösung, die außer der zu untersuchenden Doppelstrang-DNA alle anderen Komponenten enthält, dient destilliertes Wasser. Die Absorption $[A]$ wird bei 260 nm bestimmt, da die heterozyklischen, stickstoffhaltigen Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge aufweisen. Hierbei entspricht eine Absorption $[A_{260}]$ von 1,0 bzw. 1 OD (optische Dichte Einheit) einer Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA. Zur Untersuchung möglicher Proteinkontamination der Probe wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm $[A_{280}]$ gemessen, da Proteine bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen. Der gebildete Quotient A^{260}_{280} gibt somit Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe und sollte bei einer sauberen DNA-Isolierung einen mittleren Wert von 1,8 besitzen. Die Genauigkeit der Messwerte lässt sich erhöhen, indem man 3 unabhängige Messungen vornimmt und den Mittelwert davon bildet.

Aus der ursprünglichen Stammlösung wird eine Verdünnung mit DEPC-Wasser von der Konzentration 10 ng/µl DNA hergestellt, die bis zum Gebrauch bei -4°C verwahrt, während die Stammlösung bei -80°C tiefgefroren wird.

2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR *englisch*: polymerase chain reaction) erlaubt es, definierte DNA-Abschnitte eines bestimmten Ausgangsmaterials ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen *in vitro* mittels eines Systems von

aufeinander folgenden DNA-Synthesen zu vermehren (amplifizieren). Aus einer heterogenen Kollektion von DNA-Sequenzen kann man so selektiv eine bestimmte Ziel-DNA-Sequenz vermehren. Das Prinzip der PCR-Methode beruht auf der enzymatischen Vermehrung eines einzelnen DNA-Moleküls, das so in wenigen Stunden millionenfach angereichert werden kann und in genügender Menge für weitere Untersuchungen, z.B. Nachweis von Mutationen, zur Verfügung steht [White et al., 1989]. Da bei der PCR-Technik bestimmte DNA-Polymerasen zur Anwendung kommen, nennt man das Verfahren Polymerase-Kettenreaktion.

Die PCR-Methode basiert im Prinzip auf den Mechanismen der DNA-Replikation. Polymerasen wie die DNA-Polymerase I, die in Bakterienzellen die Reparatur von DNA-Schäden übernimmt, können aus freien Desoxynukleosidtriphosphaten einen DNA-Strang synthetisieren. Sie benötigen dazu einen DNA-Einzelstrang als Vorlage (Template), an den sie in 5'-Richtung einen komplementären zweiten Strang heransynthetisieren. Einzelsträngige DNA entsteht *in vitro* durch Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA. Da DNA-Polymerasen zur Synthese als Startpunkt doppelsträngige DNA benötigen, benutzt man als Startstelle für die Polymerisierungsreaktion einen Primer. Ein Primer ist ein kurzes einzelsträngiges DNA-Stück mit einem freien 3'-Hydroxylende, das mit dem Template einen zumindest kleinen doppelsträngigen Bereich bildet. Für die Konstruktion zweier Oligonukleotid-Primer ist daher Voraussetzung, dass der zu amplifizierende DNA-Abschnitt zwischen zwei kleinen Regionen bekannter Sequenz liegt². Als Primer verwendet man synthetisch herstellbare Oligonukleotide bestehend aus etwa 15-25 Nukleotiden, die durch Bindung an die komplementäre Basensequenz im Template den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Die Sequenz der Oligonukleotid-Primer wird entweder aus Publikationen oder anhand der bekannten Gensequenz eigenständig oder mit Computersoftware entwickelt. Der Forward-Primer besteht aus einer antegraden DNA-Basensequenz des Forward-Stranges im 5'-Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, der Reverse-Primer aus einer retrograden des Reverse-Stranges im 3'-Bereich. Da sehr hohe Temperaturen für die Denaturierung und Hybridisierung nötig sind, verwendet man thermostabile DNA-Polymerasen, damit nicht nach jedem Amplifikationsschritt eine neue Enzymprobe zum Reaktionsansatz gegeben werden muss, wie es noch im ursprünglichen PCR-Protokoll üblich war [Mullis und Faloona, 1987]. Diese Probleme wurden mit der Einführung der gereinigten thermostabilen Taq-

² Eine Vielzahl neuerer Methoden kommt aber auch mit weniger Vorinformation aus (PCR mit degenerierenden Oligonukleotiden).

Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* [Chien et al., 1976] gelöst. Dieses Enzym ist auch bei Temperaturen von 95°C des Denaturierungsschrittes stabil und muss daher nicht jedem Zyklus erneut zugesetzt werden. Zwei Formen der Taq-DNA-Polymerase sind heute erhältlich: das gereinigte Enzyme von *Thermus aquaticus* und die gentechnisch hergestellte Form synthetisiert in *Escherichia coli* (AmpliTaq™).

Die DNA-Vorlage wird zuerst in Gegenwart der beiden Primer sowie den vier Desoxynucleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP als DNA-Vorstufen durch Erhitzen in Einzelstrang-DNA überführt (denaturiert). Ein hoher Überschuss an Primern verhindert ein Renaturieren der beiden Elternstränge. Das Reaktionsgemisch wird dann herabgekühlt auf eine Temperatur, die es den Oligonukleotid-Primern ermöglicht an ihre Ziel-Sequenz zu binden (so genanntes Annealing oder Anheften), um danach durch die DNA-Polymerase verlängert zu werden. Die Reaktion besteht aus aufeinander folgenden Zyklen dieser drei Schritte (siehe **Abbildung 2.2**):

1. Denaturierung (Menschliche genomische DNA wird bei etwa 93-95°C denaturiert.)
2. Annealing der Primer (Dies erfolgt normalerweise bei etwa 50-70°C. Die Temperatur hängt von der Schmelztemperatur (T_m) der zu erwartenden Doppelhelix ab und liegt etwa 5°C unter der errechneten T_m .)
3. DNA-Synthese (Sie erfolgt bei etwa 70-75°C.)

Da die Produkte eines Amplifikationszyklus als Vorlage für den Nächsten dienen, wird jeder erfolgreiche Zyklus die Menge des gewünschten DNA-Produktes im Wesentlichen verdoppeln. Das Hauptprodukt dieser exponentiellen Reaktion ist ein Segment doppelsträngiger DNA, dessen Ende durch das 5'-Ende der Oligonucleotid-Primer und dessen Länge durch die Distanz zwischen den Primern definiert ist. In der ersten Synthesephase werden beide Stränge über das durch den zweiten Primer markierte Ende hinaus dupliziert. Es entsteht so eine Bindungsstelle für den zweiten Primer. Von dieser Bindungsstelle wird ein komplementärer Strang in Gegenrichtung gebildet. Es entsteht so ein doppelsträngiges DNA-Fragment, dessen Länge durch die Primer bestimmt wird. Dieses Fragment dient als Template für einen neuen Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation (DNA-Synthese). Auf diese Weise entstehen 2^n DNA-Moleküle (n =Anzahl der Zyklen), die eine DNA-Kopie des durch die Primer begrenzten DNA-Abschnittes darstellen.

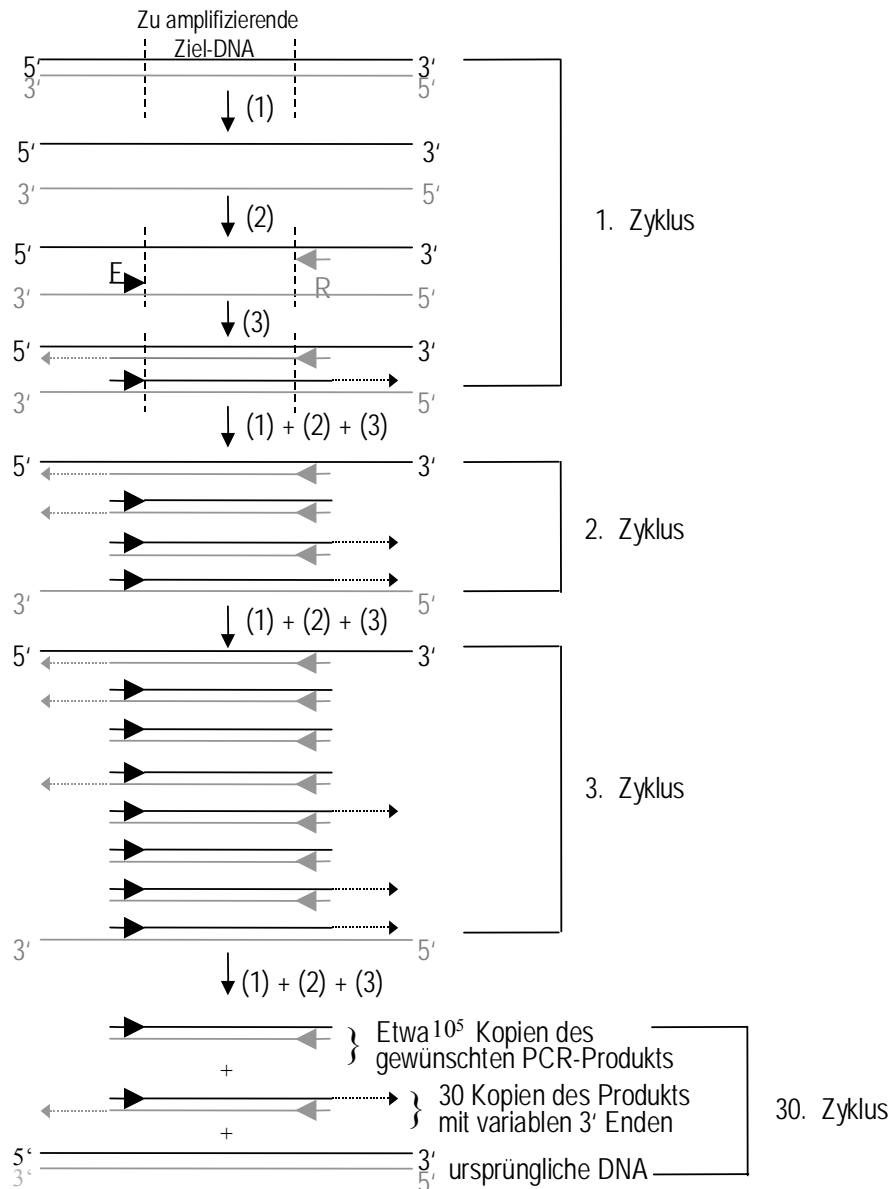


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der PCR-Methode. Die Oligonucleotid-Primer F (Forward-Primer) und R (Reverse-Primer) umrahmen den zu vermehrenden DNA-Abschnitt

- (1) Hitze-Denaturierung der Doppelstrang-DNA
- (2) Abkühlen, um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen
- (3) DNA-Synthese durch die thermostabile DNA-Polymerase

PCR-Protokoll:

Durch die weitgehende Automatisierung der PCR-Methode wird ein Reaktionsgemisch aus allen benötigten Komponenten angesetzt und in automatisierten Thermostaten (Thermocyclern) zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsansatz beinhaltet prinzipiell Forward- und Reverse-Primer im Überschuss, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Reaktionspuffer, Taq-Polymerase und DNA. Die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) werden im Überschuss (200 μ M pro dNTP) zugesetzt. Die

Konzentration der Primer beträgt normalerweise 1 μM und reicht etwa für mindestens 30 Zyklen. In einem Gesamtvolumen von 20 μl werden angesetzt:

Template-DNA (10 ng/ μl)	5,0 μl
steriles Wasser (DEPC)	9,8 μl
Puffer (10x)	2,0 μl
Gemisch aus den 4 dNTPs (2 mM)	1,0 μl
Forward-Primer (10 pmol/ μl)	1,0 μl
Reverse-Primer (10 pmol/ μl)	1,0 μl
TAQ (1U)	0,2 μl

Der Denaturierungsschritt des ersten Zyklus erfolgt bei 94°C für 5 Minuten (zur Aktivierung der Polymerase). Danach schließt sich die Zyklusphase aus den drei aufeinander folgenden Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation an.

94°C	30 sec	Denaturierung
50-70°C	30 sec	Annealing (Temperatur ³ abhängig von Primer)
72°C	30 sec	Elongation

Die Zyklusanzahl von 25-30 variiert je nach benötigter DNA-Menge und Fragmentlänge. Dann schließt sich ein DNA-Synthese-Schritt bei 72°C für 7 Minuten an (Holding) zur Auffüllung nicht vollständiger Fragmente.

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgt mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.3) qualitativ bzw. semiquantitativ im Vergleich mit einem DNA-Längenstandard (base-pair-ladder).

2.3.3 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Makromoleküle wie Nukleinsäuren, die nicht durch andere Verfahren adäquat separiert werden können, trennt man durch Elektrophorese in einem hydrophilen, gelartigen Trägermaterial.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Gelelektrophoresen in Agarose oder Polyacrylamid durchgeführt, da sich diese hervorragend zur Trennung, Identifizierung

³ Die Temperatur, die man für das Annealing der Primer wählt, ist immer ein Kompromiss. Die Amplifikation ist effizienter bei niedrigeren Temperaturen (37°C), aber dann steigt die Rate der an ektopischen Stellen gebundenen Primer (mispriming). Idealerweise bestimmt man die optimale Temperatur für jedes Primerpaar experimentell, indem man verschiedene Temperaturen ausprobiert (etwa zwischen 50 und 70°C) und dann das amplifizierte PCR-Produkt in einer Agarose-Gelelektrophorese semiquantitativ bestimmt.

und Reinigung von DNA-Molekülen eignen. Grundlage bei diesem Verfahren ist eine Art Molekularsiebeffekt: Die DNA wandert durch einheitlich große Poren im Gel, wobei größere Moleküle auf Grund des stärkeren Reibungswiderstandes langsamer wandern und ihren Weg durch die Gelporen weniger effektiv finden als kleine Moleküle. Die Porenweite dieser Gele lässt sich durch Wahl der Polymerisationsbedingungen in weiten Grenzen variieren. Oberhalb einer bestimmten Molekülgröße wirkt der Siebeffekt nicht mehr, so dass sich DNA-Fragmente von mehr als 40 kb Größe nur schlecht auftrennen lassen.

Hauptladungsträger der Nukleinsäuren sind die Phosphatgruppen, die für jeden der 4 verschiedenen Nukleotidbausteine genau eine negative Ladung enthalten und somit die gleichen pK-Werte besitzen. Daher sind pH-Wert-Unterschiede zur Auftrennung von DNA-Molekülen nicht sehr effizient. Auch hängt die Wanderungsgeschwindigkeit nicht von Ladungsungleichheiten ab, sondern im Wesentlichen von der Moleküllänge, also der Anzahl der Basenpaare. Die Wanderung linearer DNA-Doppelstränge durch die Gelmatrix ist invers proportional zum Zehnerlogarithmus ihres Molekulargewichts [Helling et al., 1974], da ein konstanter Ladungs-/Masse-Quotient vorliegt. Relaxierte oder anders konformierte DNA (Form I und II) zeigt erhebliche Unterschiede im Laufverhalten, was man sich bei der SSCP-Analyse (siehe Kapitel 2.3.4) zu Nutze macht.

Die Wahl eines bestimmten Gels hängt primär von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Polyacrylamidgele eignen sich für kleine DNA-Fragmente (5-500 bp). So können hochkonzentrierte Polyacrylamidgele DNA-Moleküle auftrennen, deren Länge sich nur in 0,2% unterscheidet, z.B. in nur einem einzigen Basenpaar in 500 bp langen Fragmenten. Das macht diese Gele in der Molekulargenetik insbesondere für die Sequenzierung unentbehrlich. Agarosegele haben eine geringere Auflösung, dafür aber eine größere Separationsbreite. Mit Agarosegelen verschiedener Konzentration können DNA-Fragmente von 200 bp bis zu 50 kb aufgetrennt werden. Für noch größere DNA-Fragmente (bis zu 10000 kb) eignet sich die Pulsfeldgelelektrophorese (Wechselstrom). Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im elektrischen Feld hängt nicht nur von ihrer Größe ab. Auch die gewählten Laufbedingungen wie Stromspannung und Stromstärke, Richtung des elektrischen Feldes, Gegenwart von interkalierenden Substanzen (z.B. Ethidiumbromid), Zusammensetzung und Ionenstärke des Elektrophoresepuffers sowie die Konzentration des Trägermaterials beeinflussen die

Migration. Die Basenzusammensetzung und die Temperatur (4°C-30°C) spielt bei Agarosegelen keine entscheidende Rolle, sehr wohl aber bei Polyacrylamidgelen.

In ihrer Grundform besteht die Gelelektrophorese aus einer Elektrophoreseeinheit (Elektrophoresesapparat) und einer Spannungsversorgung. Die Elektrophoreseeinheit besteht aus der Elektrophoresekammer (Puffertank), in der das Gel vollständig eingetaucht ist. Die Elektroden befinden sich zu beiden Seiten des Gels in der Pufferlösung und sind über Kabel mit der Spannungsquelle verbunden. Während Agarosegele meist horizontal, werden Polyacrylamidgele meist vertikal ausgerichtet. In der Vertikalkammer werden Polyacrylamidgele zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Platzhalter (Spacer) voneinander getrennt sind, sodass die Acrylamid-Lösung nicht in Kontakt mit Luftsauerstoff kommt und damit die Polymerisation inhibiert wird. Lediglich die freien Gelen haben Kontakt mit der Pufferlösung.

Legt man nun zwischen Start- und Stopppseite eine Gleichspannung an, wandern die bei neutralem pH negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode.

Agarosegelelektrophorese

Trägermaterial ist das natürliche Polysaccharid Agarose. Während des Härtens formt die Agarose eine Matrix, deren Dichte bestimmt wird durch die Agarosekonzentration.

Zur Überprüfung und Auswertung der PCR werden in dieser Arbeit Agarosegele mit einer Konzentration von 1,5% (w/v) verwendet, die sich zur Auftrennung von 200 bis 3000 bp langen DNA-Fragmenten eignen. Für die Trennung nativer Doppelstrang-DNA verwendet man 1x TAE-Puffer. 1,5%-ige Agarosegele werden hergestellt, indem man 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufkocht bis eine klare, transparente Lösung entsteht. Nachdem sich die Agaroselösung auf etwa 60°C abgekühlt hat, wird 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und die noch flüssige Agarose luftblasenfrei in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach dem Aushärten kann der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Die Elektrophoresekammer wird dann soweit mit Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) aufgefüllt, dass der Flüssigkeitsspiegel etwa 0,5 cm über der Geloberfläche liegt.

Die mit 3,5 µl Loading-Dye (Probenpuffer 6x, blauer Bromphenol- und Xylene Canol FF-Farbstoff) versetzten DNA-Proben (8 µl) pipettiert man in die Geltaschen und schließt die Kammer an ein Netzgerät an. Man lässt das Gel etwa eine Stunde bei 100 mA, 100 V und 30 W laufen. Der hinzugefügte Farbstoff dient als Orientierung über die bereits zurückgelegte Laufstrecke.

Die getrennten DNA-Fragmente können im Gel direkt lokalisiert und sichtbar gemacht werden, indem man sie mit niedrigen Konzentrationen von fluoreszierendem Ethidiumbromid anfärbt und dann das Gel direkt unter UV-Licht untersucht. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, DNA-Banden anzufärben, indem sich die planare Gruppe dieser Substanz zwischen die Basenpaare der DNA einlagert (interkaliert) und intensiv orange fluoresziert. Die DNA-Fragmente werden deutlich als orange leuchtende Banden sichtbar. Die Intensität der Banden korreliert mit der Menge des jeweiligen DNA-Fragments. Die Größe der PCR-Fragmente kann durch Vergleich mit dem mitgeführten DNA-Längenstandard (100 base-pair-ladder) abgeschätzt werden. Es wird festgestellt, ob genügend DNA für weitere Untersuchungen angereichert wurde bzw. ob die amplifizierten DNA-Fragmente die richtige Fragmentlänge aufweisen. Wenn die mit amplifizierte Negativ-Kontrolle (Wasser) eine sichtbare Bande aufweist, ist der PCR-Ansatz kontaminiert und muss verworfen werden.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Es gibt nicht denaturierende Polyacrylamidgele zur Trennung von DNA-Doppelsträngen und denaturierende Gele zur Trennung von DNA-Einzelsträngen, die in Gegenwart von z.B. Formamid gegossen werden, um die Basenpaarung der Nukleinsäuren zu unterdrücken. Hier ist die Wanderungsgeschwindigkeit nahezu unabhängig von Basenzusammensetzung und Sequenz.

In Gegenwart freier Radikale, meist von APS (Ammoniumpersulfat) geliefert, und durch Stabilisierung von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine), wird eine Kettenreaktion initiiert, wobei das Monomer Acrylamid zu langen Ketten polymerisiert. Bei Vorhandensein von N,N'-Methylenbisacrylamid werden die Ketten quervernetzt und formen ein Gel, dessen Poren von der Kettenlänge (abhängig von der Acrylamidkonzentration) und der Quervernetzung bestimmt werden. Sie werden z.B. für die Analyse der DNA-Sequenzierung verwendet. Länge und Genauigkeit der Nukleotidsequenz werden beide von der Qualität des Polyacrylamidgels bestimmt. Für DNA-Sequenzen mit einer Länge von 25-400 Nukleotiden verwendet man Polyacrylamidgele mit einer Acrylamidkonzentration von 6%.

Die Dicke des Gels (hier 0,5 mm) wird bestimmt durch die Dicke der Plastikstreifen, die als Platzhalter (Spacer) zwischen der vorderen und hinteren Glassplatte dienen. Die meisten Gele weisen eine konstante Dicke auf, und auf Grund der logarithmischen

Beziehung zwischen der Länge der DNA-Fragmente und ihrer Mobilität, liegen die DNA-Banden am Gelende weit auseinander und drängen sich am Gelanfang.

Zur Herstellung denaturierender Acrylamidgele werden hier fertige Lösungen verwendet:

SequaGel-6™

6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 19:1

0,1 M tris-Borat

2 mM EDTA, pH 8,3

8,3 M Harnstoff

TEMED

Gele zur DNA-Sequenzierung werden in einer Konzentration von 6% mit 1x TBE-Puffer hergestellt. Zur Polymerisation wird APS (490 µl 10%-ig) hinzu gegeben und das noch flüssige Gel in die Vertikalkammer gegossen. Die Gelkammer wird in den automatischen Sequenzierer eingesetzt, wobei die freien Gelenden in den Laufpuffer (0,6x TBE-Puffer) eintauchen. Die Taschen werden nun mit den DNA-Proben (Ergebnisse der PCR mit ddNTPs) befüllt, die mit 4 µl Formamid-Loading-Dye versetzt sind. Nach Anlage der Anode und Kathode wird die automatische DNA-Sequenzierung gestartet (siehe Kapitel 2.3.5).

2.3.4 SSCP

Die Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (single-strand conformational polymorphism analysis, SSCP oder SSCA) ist ein Verfahren zur Detektion, ob eine DNA-Probe in irgendeiner Form von der Standardsequenz abweicht. Diese schnelle und sensitive Screening-Methode untersucht bei bekannter DNA-Sequenz Veränderungen in der Nukleotidbasenabfolge, die durch Mutationen bzw. Polymorphismen hervorgerufen werden [Orita et al., 1989]. So können Veränderungen in Genen aufgespürt werden, die sich im Austausch, seltener in Einfügung oder Verlust, einer einzelnen Base manifestieren (sogenannte Punktmutationen).

Einzelstrang-DNA neigt zur Rückfaltung und zur Ausbildung komplexer Strukturen, die durch schwache intramolekulare Wechselwirkungen, besonders durch Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarung, stabilisiert werden. Die elektrophoretische Mobilität solcher Strukturen in einem nicht denaturierenden Gel hängt nicht nur von der Länge der Molekülkette ab, sondern auch von der räumlichen Anordnung

(Konformation), die wiederum durch die DNA-Sequenz bedingt ist [Orita et al., 1989]. So führt unter Umständen eine Basensubstitution zu einer Konformationsänderung des DNA-Abschnittes, mit der Folge eines Mobilitätsunterschiedes in einer nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (**Abbildung 2.3**).

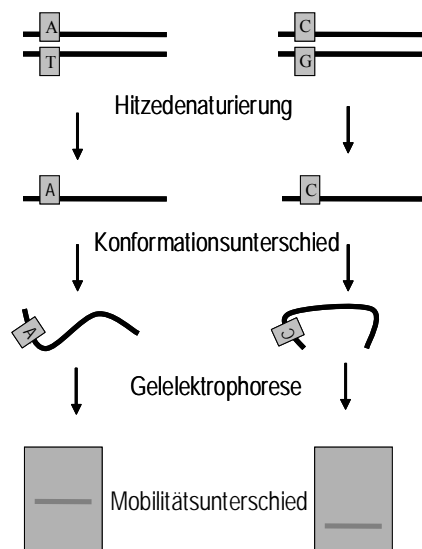


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der SSCP-Analyse

Das Prinzip der SSCP-Analyse beruht auf dem Vergleich von Laufgeschwindigkeiten und Laufverhalten gleicher Bereiche denaturierter DNA-Abschnitte verschiedener Proben unter Variation der Elektrophorese-Bedingungen wie z.B. Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes, etc. Voraussetzung ist die Kenntnis der Basensequenz des Gens. Für eine SSCP-Analyse amplifiziert man DNA-Proben mittels PCR, wobei die DNA-Fragmente eine Länge von 300 bp nicht überschreiten sollte. Nach Überführen in Einzelstrang-DNA durch Hitzenaturierung erfolgt eine nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die entsprechenden Primer sollten so gewählt werden, dass sie im Bereich der Introns liegen und somit die gesamte kodierende Sequenz und die dazugehörigen splice-sites abdecken. Bei DNA-Fragmenten mit einer Größe bis zu 200 bp können die meisten Punktmutationen als Mobilitäts-Shift detektiert werden [Orita et al., 1989]. Bei größeren Exons ist es sinnvoll mehrere Fragmente mit überlappenden Sequenzen zu konstruieren. Entweder markiert man die Primer radioaktiv oder macht die unmarkierten Reaktionsprodukte nach Beendigung der Elektrophorese mit einer Silberfärbung sichtbar. Kontrollproben sind bei *jeder* SSCP-Analyse erforderlich, um Unterschiede zum Wildtypmuster detektieren zu können, denn das genaue Bandenmuster hängt sehr stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen jedes einzelnen Gels ab. Diese Methode ist einfach und empfindlich genug

Veränderungen in der Nukleotidsequenz aufzuspüren, zeigt jedoch weder die Art noch die Position einer nachgewiesenen Mutation an bzw. ob die Mutation überhaupt wirksam ist.

SSCP-Protokoll:

Zunächst werden die jeweiligen DNA-Fragmente der einzelnen Proben mittels PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.3.2) und zu gleichen Teilen (3,5 µl) mit Formamid versetzt. Es erfolgt eine Hitze-Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten im Thermomixer (Heizblock). Bis die Proben auf das Gel in die dafür vorgesehenen Taschen (Brunnen) aufgetragen werden, platziert man sie direkt nach der Denaturierung in Eiswasser, damit ein Re-Annealing der Einzelstrang-Produkte vermieden wird.

Das trockene Polyacrylamidgel wird in einem GelPool mit 25 ml Gelpuffer ungefähr eine Stunde unter ständigem Schwenken rehydriert, wobei die Bildung von Luftblasen unter dem Gel zu vermeiden ist. Das Elektrophoresesystem ist mit einem Kühlaggregat verbunden, sodass die Läufe bei beliebigen Temperaturen durchführbar sind. Nach Ablauf der Rehydrationszeit wird das Gel vorsichtig mit Filterpapier getrocknet, ohne die Matrix zu beschädigen. Das Gel wird in der Mitte der Kühlplatte der Elektrophoreseeinheit so platziert, dass die Brunnen sich auf der Seite der Kathode befinden. Zuvor wird die Kühlplatte mit 70%-igen Ethanol benetzt, um ein gleichmäßiges Haften des Gels ohne Bildung von Luftblasen zu erzielen. Zwei mit Elektrodenpuffer voll gezogene Elektrodenstreifen werden etwa 5 mm auf den Gelrand gelegt. Nach befüllen der Brunnen mit je 4 µl der Proben und Eingabe der Laufbedingungen wird die Elektrophorese gestartet.

Soll die Gelelektrophorese bei einer Lauftemperatur von 15°C durchgeführt werden, lässt man die Proben zunächst 10 Minuten lang bei 200 V, 23 mA und 5 W ins Sammelgel laufen und anschließend etwa 60 Minuten lang bei 600 V, 30 mA und 18 W durch das Trenngel wandern. Wählt man eine Temperatur von 4°C, so wird die Elektrophorese für 4 Stunden bei 200 V, 23 mA und 5 W durchgeführt, da es durch die Wärmeentwicklung bei höheren Spannungen zu Kondenswasserbildung auf der Geloberfläche kommt und die Qualität der Elektrophorese erheblich beeinträchtigt werden kann.

Um nach der Elektrophorese die DNA-Banden sichtbar zu machen, wird eine Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Diese zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und gute

Reproduzierbarkeit aus, die es erlaubt, DNA-Banden bis zu 20-50 pg zu detektieren [Heukeshoven und Dernick, 1985].

Damit das Gel sich gleichmäßig färbt, wird es während der einzelnen Schritte des Färbevorgangs auf einer Plattform automatisch geschwenkt. Zur Fixierung wird das Gel in einem Metallbecken für mindestens 30 Minuten in 250 ml Fixierlösung 1x inkubiert. Nach Abgießen der Fixierlösung erfolgt die Silberimprägnierung mit 250 ml Silbernitratlösung 1x für 30 Minuten. Danach wird die Silbernitratlösung dekantiert und das Gel mit destilliertem Wasser für einige Minuten gewaschen. Währenddessen setzt man die Entwicklerlösung an, die auf Grund ihrer Instabilität immer erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden sollte. Zu 30 ml Entwicklerlösung 5x werden 250 µl Formaldehyd und 250 µl Natriumthiosulfat pipettiert und auf 250 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, kräftig geschüttelt und auf das Gel gegeben. Nach Zugabe der fertigen Entwicklerlösung zum Gel beobachtet man das langsame Anfärben der Banden. Nach etwa 1 bis 6 Minuten wird der Entwicklungsvorgang gestoppt, indem man die Lösung abkippt und 250 ml Stopp- und Konservierungslösung 1x für mindestens 30 Minuten hinzu gibt. Bei zu langer Einwirkung der Entwicklungslösung färbt sich das Gel dunkel, was einen deutlichen Qualitätsverlust bedeutet. Abschließend wird das Gel nach einem Waschvorgang in destilliertem Wasser auf ein Papiertuch gelegt und luftgetrocknet.

Pro DNA-Fragment (Exon) wird eine native, nicht denaturierte Wildtyp-Probe als Kontrolle mitgeführt, ebenso eine Negativ-Kontrolle (Wasser), um eine Verunreinigung des PCR-Ansatzes auszuschließen. Zur Auswertung vergleicht man die Banden der einzelnen Proben mit denen der Kontrollen und sucht nach Abweichungen im Bandenmuster (so genannten Shifts). Unterschiedlichen Bandenmustern können auch häufig vorkommende Polymorphismen zu Grunde liegen. Daher müssen mindestens 25 Wildtyp-Kontrollen (also 50 Allele) mit dem aberranten Bandenmuster verglichen werden. Da man von einem Bandenunterschied nicht auf eine wirksame Mutation rückschließen kann, müssen letztlich alle Proben, die abweichende Bandenmuster aufweisen, sequenziert werden.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotid-Sequenz (Basenabfolge) der DNA auf Molekülebene gibt es heute prinzipiell zwei schnelle Sequenzierungs-Techniken, die enzymatische Kettenabbruch-Methode [Sanger et al., 1977] und die chemische Gradienten-Methode

[Maxam und Gilbert et al., 1977]. Bei der Methode nach Maxam-Gilbert wird die Original-DNA an bestimmten Stellen chemisch verändert und gespalten. Jede dieser chemischen Reaktionen ist spezifisch für eine bestimmte Base bzw. eines Basentypus. Die heute gültige Kettenabbruch-Methode entwickelte sich aus der +/- Sequenzierungstechnik [Sanger und Coulson, 1975] mit den drei Grundsätzen: (1) dem Gebrauch von spezifischen Primern zur DNA-Verlängerung durch die DNA-Polymerase, (2) dem basenspezifischen Kettenabbruch und (3) der Verwendung von Polyacrylamidgelen, die einzelsträngige DNA-Ketten mit nur einem Nukleotid Längenunterschied auftrennen können. Aber erst durch die Einführung der Kettenabbruch-Didesoxynukleotide [Sanger et al., 1977] wurden enzymatische Sequenzierungs-Methoden weit verbreitet. Heute ist die enzymatische Kettenabbruch-Methode nach Sanger die bevorzugte Sequenzierungsmethode aufgrund ihrer Verlässlichkeit und Genauigkeit und wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Zunächst wird mit der PCR-Methode (Kapitel 2.3.2) der zu untersuchende Gen-Abschnitt amplifiziert und in einer Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.3) festgestellt, ob genügend DNA des zu untersuchenden DNA-Abschnittes angereichert wurde. In der folgenden Sequenzreaktion werden durch sich wiederholende Denaturierungs- und Elongationsschritte DNA-Fragmente gewonnen, deren Länge durch den Einbau eines modifizierten Nukleosidtriphosphates determiniert werden. Zusätzlich zu den konventionellen Nukleotidbausteinen, 2'-Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), enthält der Reaktionsansatz basenspezifische 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), sogenannte Abbruchnukleotide. Sie sind Analoga der normalen dNTPs, unterscheiden sich von diesen aber dadurch, dass ihnen nicht nur am 2'-Kohlenstoff, sondern auch am 3'-Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe fehlt. Das Fehlen einer 3'-Hydroxylgruppe verhindert die Bildung einer Phosphodiesterbindung am 3'-Kohlenstoffatom mit dem nachfolgenden dNTP, so dass die weitere Verlängerung der DNA-Kette unmöglich wird. Es kommt zum Kettenabbruch. Es werden parallel vier basenspezifische Reaktionen durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthält die vier dNTPs und in einer bestimmten Konzentration noch jeweils das Abbruchnukleotid einer der vier Basen. Konventionelles dNTP und entsprechendes ddNTP-Analogon konkurrieren an jeder der vielen Positionen in der DNA, an denen das entsprechende Nukleotid vorkommt, um den Einbau in die wachsende DNA-Kette. Da aber die Konzentration des ddNTP-Analogons wesentlich geringer ist als die des zugehörigen konventionellen dNTPs, kommt es in statistischer Verteilung zur Kettenverlängerung

und selten, aber basenspezifisch zum Abbruch der DNA-Synthese. Eine bestimmte basenspezifische Reaktion erzeugt also für jede einzelsträngige DNA-Vorlage eine Population von Oligonukleotid-Ketten, deren Längen bestimmt werden durch den Abstand zwischen dem Primerende, der zur Initiierung der DNA-Synthese benutzt wurde, und der Stelle des frühzeitigen Kettenabbruchs durch das jeweils zugefügte ddNTP. Durch die statistische Verteilung entspricht die Kollektion der vorhandenen Fragmentlängenunterschiede der Menge des entsprechenden Nukleotids in dieser Basenfolge. Somit geben die Längen der einzelnen Fragmente die Position der Base im Matrizenstrang wieder. Alle vier Ansätze ergeben dann eine ineinander geschachtelte Fragmentreihe, die elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet wird (**Abbildung 2.4**).

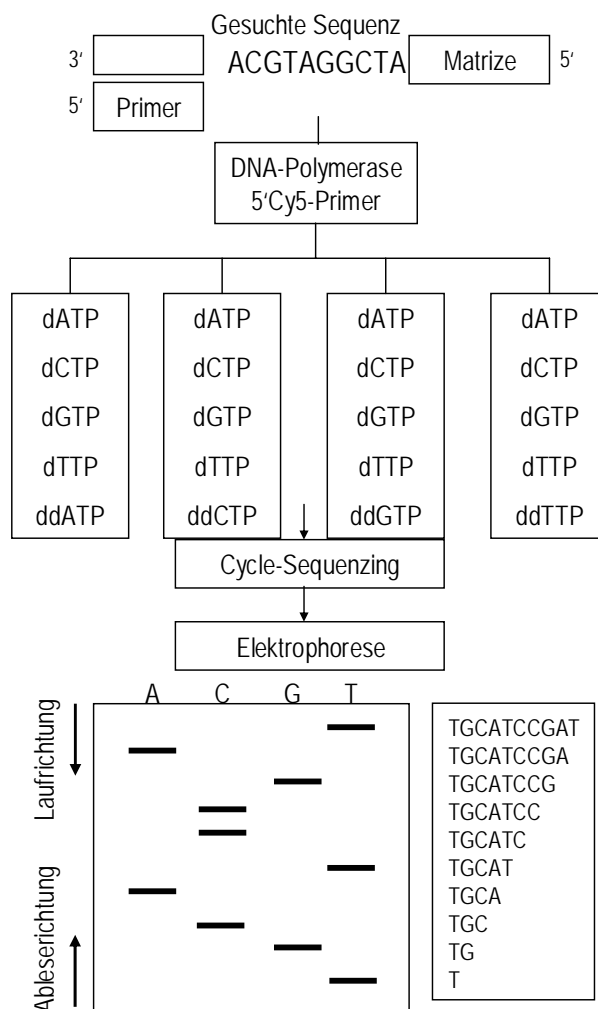


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der enzymatischen DNA-Sequenzierung

Um die verschieden großen Fragmente identifizieren zu können, enthalten die Reaktionsprodukte markierte Gruppen. Dafür verwendet man entweder markierte

Primer oder es werden markierte Nukleotide in die DNA eingebaut. Bei der herkömmlichen Sequenzierungs-Technik werden radioaktiv markierte dNTPs (z.B. [α - 32 P]dNTPs oder besser [α - 35 S]dNTPs) verwendet, die vier Reaktionsansätze nebeneinander auf das Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese eine Autoradiographie des getrockneten Gels angefertigt. Da die kürzeren DNA-Fragmente im elektrischen Feld schneller als die längeren wandern, lässt sich die Sequenz schließlich durch Ablesen des Gels von unten nach oben ermitteln, wobei man die Sequenz in Richtung 5' des Stranges, der zur ursprünglich eingesetzten DNA-Vorlage komplementär ist, erhält.

Heute verwendet man automatisierte Sequenzier-Geräte, um die Effektivität dieses Verfahren zu steigern. Automatisierte Systeme für die Sequenzierung fluoreszenzmarkierter DNA basieren auf dem Prinzip, Primer oder Didesoxynukleotide mit einer fluoreszierenden chemischen Gruppe (Fluorophor) zu versehen. Während der Elektrophorese misst ein Detektor (Rotlichtlaser) die Fluoreszenzsignale der vorbeiwandernden DNA an einem fixen Punkt im Gel und zeichnet sie auf (**Abbildung 2.5**). Verwendet man zur Kennzeichnung der vier basenspezifischen Reaktionsansätze vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, können im Gegensatz zur herkömmlichen Technik alle vier Ansätze auf eine einzige Gelspur aufgetragen werden. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in Form von farbenspezifischen (und damit basenspezifischen) Intensitätsprofilen für jedes andersartige Fluorophor. Gleichzeitig wird die Sequenz elektronisch gespeichert.

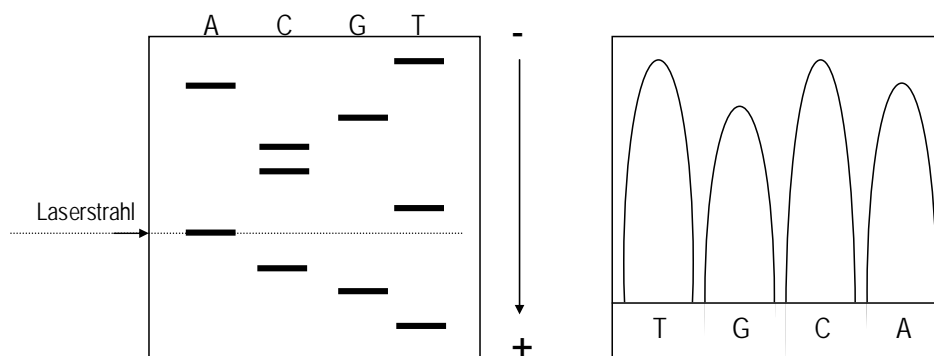


Abbildung 2.5 Funktionsprinzip eines automatischen Sequenzierers

Protokoll für die DNA-Sequenzierung:

All jene Patientenproben, die in der vorangegangenen SSCP-Analyse ein im Vergleich zum Wildtyp abweichendes Bandenmuster aufwiesen, werden der DNA-Sequenzierung zugeführt.

Für diese Arbeit steht ein automatisches Sequenzier-Gerät zur Verfügung und zur Markierung der DNA-Fragmente werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Primer verwendet. Zur Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes in die DNA-Fragmente wird ein Universal-Sequenzierprimer verwendet, der am 5'-Ende mit dem langwelligen Farbstoff Cyanin-5 (Cy5) markiert ist.

Im Prinzip besteht die Sequenzierungsreaktion aus drei Schritten: (1) der Amplifizierung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts mittels PCR, (2) der eigentlichen Sequenzierungsreaktion (sogenanntes Cycle-Sequenzing) und (3) die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragment-Populationen. Zur Amplifizierung der DNA-Abschnitte werden prinzipiell die gleichen Primerpaare eingesetzt, die auch zur SSCP-Analyse verwendet wurden, sie werden nur mit einem kleinen Zusatz versehen. Damit der universelle fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer an den DNA-Abschnitt binden und die DNA-Synthese für das Cycle-Sequenzing starten kann, fügt man an die 5'-Sequenz der PCR-Primer die für den Universalprimer spezifische Sequenz an. Dieser Sequenzabschnitt wird einheitlich an jeden PCR-Primer der verschiedenen DNA-Abschnitte (Exone) angehängt, sodass der universelle Sequenzprimer immer spezifisch binden kann.

In dieser Arbeit werden sowohl der kodierende als auch der nicht-kodierende DNA-Strang zur Verifizierung der Ergebnisse sequenziert. Methodisch werden dazu in zwei unabhängigen Sequenzierungsreaktionen zwei verschiedene Universal-Sequenzierprimer (ein Forward- und ein Reverse-Primer) eingesetzt, wobei die Sequenz des Forward-Sequenzierprimers (P172) an das 5'-Ende des Forward-PCR-Primers angehängt wird und die Sequenz des Reverse-Sequenzierprimer (M13) analog an das 5'-Ende des Reverse-PCR-Primers. Die angehängten Nukleotid-Sequenzen müssen so gewählt sein, dass sie nicht mit der PCR interferieren. Sie sind in **Tabelle 2.1** dargestellt [De Bellis et al., 1992].

Tabelle 2.1 Forward- und Reverse-Primer (mit 5'-Cy5) für die DNA-Sequenzierung

Name	5'-3'-Sequenz
P172	TAT TAT AGG GCG AAT TGG GT
M13	TAT GTA AAA CGA CGG CCA GT

Im ersten Schritt wird nun eine leicht modifizierte PCR durchgeführt, in der man Forward- und Reverse-PCR-Primer durch die modifizierten Primer ersetzt und die doppelte Menge ansetzt, jedoch alle anderen Parameter beibehält (Kapitel 2.3.2). Mit einem Agarosegel wird die Homogenität der PCR-Produkte überprüft. Um die PCR-

Produkte von überschüssigem Primer zu reinigen und den Salzgehalt zu reduzieren, werden MikroSpin-Säulen verwendet. Hierzu wird die Säule in TE-Puffer kurz re-äquilibriert und bei 3000 Umdrehungen/Min für 1 Minute zentrifugiert. Der TE-Puffer wird verworfen und die Säule mit dem PCR-Produkt beladen und nochmals bei 3000 Umdrehungen/Min für 2 Minuten zentrifugiert. Das im Eppendorf-Röhrchen aufgefangene DNA-Produkt kann nun für die Sequenzierungsreaktion weiterverwendet werden. Für die Reaktion werden nun vier Reaktionsgemische, entsprechend den vier verschiedenen Didesoxynukleotiden, angesetzt. Da beide Stränge sequenziert werden, erhält man so im Grunde acht Reaktionsansätze pro zu untersuchendem DNA-Abschnitt, je vier basenspezifische für die Vorwärts- und vier für die Rückwärts-Sequenzierung. Es werden pro DNA-Probe also zwei Ansätze bestehend aus jeweils 19,8 µl DEPC-Wasser und jeweils 4,4 µl gewaschene DNA, sowie 2,2 µl Forward-Primer bzw. Reverse-Primer hergestellt. Pro PCR-Röhrchen werden 2 µl der Reagenz A, C, G bzw. T vorgelegt, wobei in jeder Reagenz alle dNTPs und je ein ddNTP enthalten sind (z.B. Reagenz A mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP und ddATP). Die Thermo Sequenase DNA Polymerase ist ebenfalls in jeder Reagenz enthalten. Anschließend erfolgt die definitive Sequenzierungsreaktion (Cycle-Sequenzierung), wobei im ersten Schritt bei 95°C für 3 Minuten denaturiert wird. Dann erfolgen 26 Zyklen:

95°C	30 sec	Denaturierung
65°C	30 sec	Annealing
65°C	30 sec	Elongation

Jede Probe wird mit 4 µl Formamid Loading-Dye versetzt und in ein 6%-iges Polyacrylamidgel (Kapitel 2.3.3), das in einen automatischen Sequenzierer eingehängt wird, der Reihenfolge nach A, C, G und T von links nach rechts aufgetragen. Nach Anlage der Elektroden wird die denaturierende Elektrophorese bei 720 Minuten, 1500 V, 38 mA und 34 W gestartet. Die Detektion der DNA-Fragmente mittels Rotlichtlasers wird computergestützt aufgezeichnet [Chadwick et al. 1996].

Nach Ende der Elektrophorese erfolgt die Auswertung mit Hilfe der AM V3.0 Software, wobei Rohdaten analysiert und prozessiert werden. Die Fragmentreihen werden automatisch ineinander integriert, so dass eine fortlaufende Sequenz entsteht.

Die Sequenzen der Wildtyp-DNA, die als Kontrolle zu jedem DNA-Abschnitt (Exon) mitsequenziert wurde, werden mit der publizierten Originalsequenz verglichen, um methodische Unsicherheiten zu erkennen. Dann werden die Sequenzen der DNA-

Proben mit der Originalsequenz und der Wildtyp-Kontrolle verglichen und nach Punktmutationen gesucht. Einfache Deletionen (Fehlen einer Base) oder Insertionen (Einfügen einer Base) führen zu einer Rasterverschiebung (frameshift). Substitutionen zeigen einen Basenaustausch in Form von Transitionen (Purinbasenaustausch) oder Transversionen (Pyrimidinbasenaustausch). Es kann eine eindeutige Entscheidung über homozygote und heterozygote Mutationen getroffen werden, da beide parenterale Chromosome sequenziert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der Patienten

3.1.1 Klinische Präsentation

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit umfasst 25 Familien mit 33 betroffenen Individuen, die sich mit klinischen Symptomen der FHHNC präsentierten und somit einer molekulargenetischen Untersuchung zugeführt worden waren.⁴

In **Tabelle 3.1** sind die klinischen Daten zusammengefasst und den Mutationen im CLDN16-Gen gegenübergestellt.

Die Familien sind unterschiedlicher ethnischer Herkunft, mit einem Großteil der Familien aus Osteuropa stammend (Polen, Tschechische Republik, Slowenien, Bosnien-Herzegowina und Mazedonien). Auch die meisten deutschen Familien kommen aus dem östlichen Teil Deutschlands, während die übrigen Familien tunesischer, algerischer, französischer und türkischer Herkunft sind. Elterliche Konsanguinität findet sich in fünf Familien (F3, F4, F8, F9 und F10). In acht Familien sind mehr als ein Kind betroffen (F1, F2, F5, F7, F8, F9, F14 und F21), wobei es sich in F14 um eineiige Zwillinge handelt. In einer Familie konnten keine Informationen zur Herkunft oder den verwandtschaftlichen Beziehungen der Eltern erhoben werden, da es sich um ein adoptiertes Kind handelt.

Zwanzig der Betroffenen sind weiblichen und dreizehn männlichen Geschlechts, sodass das Verhältnis etwa 1:0,7 beträgt. Das mediane Alter bei Manifestation der Erkrankung liegt bei 3,5 Jahren mit der frühesten Manifestation mit zwei Monaten bei drei Patienten und der ältesten Patientin mit 18 Jahren. In den Familien mit mehreren Betroffenen führte die Diagnosestellung eines der Kinder zur Untersuchung der Geschwister. Bei einem Patienten (F21-1) wurde im Alter von drei Monaten bei einer abdominalen Sonographie im Rahmen einer Gastroenteritis die Nephrokalzinose als Zufallsbefund entdeckt und durch weitere Untersuchung die klinische Diagnose gestellt.

Die häufigsten Symptome, die sich bei Erstmanifestation der Erkrankung zeigten, sind wiederholte Harnwegsinfekte, Polyurie/Polydipsie, Hämaturie und/oder eine

⁴ Die klinischen Daten des Geschwisterpaares der Indexfamilie F1 und der Patienten F10 und F25 wurden im Rahmen von Fallberichterstattungen [Manz et al., 1978; Gregoric et al., 2000; Tasic et al., 2005] und die Mutationsanalysen von acht Familien (F1-F8) wurden bereits publiziert [Weber et al. 2000]. Ein Follow-up des Geschwisterpaares F5 und F14 und des Patienten F6 [Wolf et al., 2002; Zimmermann et al., 2006] und des Geschwisterpaares F8 [Kuwertz-Bröking et al., 2001] wurde veröffentlicht. Eine Nachfolgestudie mit Einschluss aller 33 Patienten von F1-F25 zu einer erneuten Analyse von Geno- und Phänotyp wurde kürzlich publiziert [Konrad et al., 2008].

abakterielle Leukozyturie. Einige der Patienten fielen mit Nephrolithiasis, cerebralen Krampfanfällen, Muskeltetanien oder Bauchschmerzen auf. Die Symptome bei Erstmanifestation sind, nach Häufigkeit geordnet, in **Tabelle 3.2** wiedergegeben.

Extrarenale Manifestationen der Erkrankung im Sinne von okulären Anomalien finden sich bei zehn Patienten, wobei am häufigsten Kurzsichtigkeit auffiel (sechs Patienten von 31, 19%), seltener Weitsichtigkeit (ein Patient von 31, 3%), Stabsichtigkeit (zwei Patienten von 31, 7%), und/oder Strabismus (ein Patient von 31, 3%). Weitere extrarenale Manifestationen wie z.B. Hörminderung oder Taubheit fielen in diesem Kollektiv nicht auf.

Bei Auftreten erster Symptome der Erkrankung wurden folgende differentialdiagnostische Überlegungen von den behandelten Pädiatern in Betracht gezogen: idiopathische Hyperkalziurie, Markschwammniere, Dent's disease, distal-renal-tubuläre Azidose (dRTA), Hyperprostaglandin-E-Syndrom/antenatales Bartter-Syndrom und/oder Gitelman-Syndrom.

Tabelle 3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs ^a

Familie	Ge- schlecht	Herkunft	Konsan- guinität	Zygotität	Nukleotaustausch	Konsequenz der Mutation	Alter bei Manifesta- tion	Alter z. Zeitpkt. d. Studie	Aktuelle Nieren- funktion	Niedrigstes S-Magnesium (mmol/l)	Nephro- lithi- asis	HWI	okuläre Anomalien
F1-1	w	Deutschl.	nein	comp hetero	350(TGG→TAG)-453(TTG→TTT)	Trp117X-Leu151Phe	2 Mon.	41 J.	Tx	0.40	ND	+	-
F1-2	w	Deutschl.	nein	comp hetero	350(TGG→TAG)-453(TTG→TTT)	Trp117X-Leu151Phe	7 J.	39 J.	Tx	0.46	+	+	-
F2-1	w	Deutschl.	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-453(TTG→TGG)	Leu151Phe-Leu151Trp	18 J.	42 J.	Tx	0.23	+	+	-
F2-2	m	Deutschl.	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-453(TTG→TGG)	Leu151Phe-Leu151Trp	12 J.	36 J.	Tx	0.40	-	-	-
F3	w	Türkei	ja	homo	593(GGT→GCT)	Gly198Ala	6 Mon.	24 J.	CNI	0.40	-	+	S
F4	w	Tunesien	ja	homo-(homo)	715(GGA→AGA)-[165/ 166 del(GG)→ins(C)]	Gly239Arg-(Arg55fs)	4 J.	21 J.	Dialyse	0.25	-	-	M, A
F5-1	w	Deutschl.	nein	comp hetero	434(CTG→CCG)-453(TTG→TTT)	Leu145Pro-Leu151Phe	4 J.	17 J.	GFR>60	0.48	-	-	-
F5-2	w	Deutschl.	nein	comp hetero	434(CTG→CCG)-453(TTG→TTT)	Leu145Pro-Leu151Phe	7 J.	20 J.	GFR>60	0.50	-	-	-
F6	m	Bosnien	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-715(GGA→AGA)	Leu151Phe-Gly239Arg	6 J.	14 J.	GFR>60	0.30	ND	-	-
F7-1	m	Tschechien	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	4 J.	11 J.	CNI	0.51	+	+	H, A
F7-2	m	Tschechien	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	9 Mon.	8 J.	CNI	0.43	+	+	-
F8-1	m	Tunesien	ja	homo-(homo)	421(CAT→GAT)-[165/ 166 del(GG)→ins(C)]	His141Asp-(Arg55fs)	1 J. 6 Mon.	5 J.	Dialyse	0.55	-	+	-
F8-2	w	Tunesien	ja	homo-(homo)	421(CAT→GAT)-[165/ 166 del(GG)→ins(C)]	His141Asp-(Arg55fs)	4 J.	8 J.	CNI	0.46	-	+	-
F9-1	w	Algerien	ja	homo	646/647(CGT→ACT)	Arg216Thr	ND	23 J.	CNI	0.49	-	+	-
F9-2	m	Algerien	ja	homo	646/647(CGT→ACT)	Arg216Thr	ND	28 J.	Tx	ND ^b	+	+	ND
F10	w	Slovenien	nein	homo	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	7 J.	16 J.	CNI	0.28	+	+	M
F11	w	Adoptiert	ND	homo	715(GGA→AGA)	Gly239Arg	ND	13 J.	CNI	0.48	-	+	-
F12	m	Deutschl.	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-625(GCT→ACT)- [165/166 del(GG)→ins(C)]	Leu151Phe-Ala209Thr- [Arg55fs]	11 J.	14 J.	GFR>60	0.40	-	-	-
F13	m	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	2 Mon.	9 J.	CNI	0.43	-	-	-
F14-1	w	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	3 J.	15 J.	Tx	0.23	-	-	-
F14-2	w	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	3 J.	15 J.	CNI	0.30	+	+	M
F15	w	Deutschl.	nein	homo	446(CGA→CTA)	Arg149Leu	6 J.	25 J.	Tx	0.42	ND	+	-
F16	w	Deutschl.	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-785-14(T→G)	Leu151Phe-splice-site- Mutation	3 J.	28 J.	Dialyse	0.31	+	+	M
F17	w	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	1 J.	17 J.	CNI	0.38	-	+	-
F18	w	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	9 J.	17 J.	GFR>60	0.33	-	-	-
F19	m	Deutschl.	nein	hetero	325-5(T→G)	Splice-Site-Mutation	5 J.	23 J.	Dialyse	0.57	+	+	-
F20	m	Polen	nein	comp hetero	434(CTG→CCG)-453(TTG→TTT)	Leu145Pro-Leu151Phe	2 J.	14 J.	Tx	0.61	-	-	M
F21-1	m	Tschechien	nein	comp hetero	368del(A)-434(CTG→CCG)	Asn123fs-Leu145Pro	3 Mon.	6 J.	GFR>60	0.40	-	+	-
F21-2	w	Tschechien	nein	comp hetero	368del(A)-434(CTG→CCG)	Asn123fs-Leu145Pro	2 Mon.	3 J.	GFR>60	0.58	-	+	-
F22	w	Deutschl.	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	9 Mon.	10 J.	GFR>60	0.46	+	+	M
F23	m	Tschechien	nein	comp hetero	453(TTG→TTT)-703(TCC→CCC)	Leu151Phe-Ser235Pro	6 Mon.	13 J.	CNI	0.40	-	+	-
F24	w	Frankreich	nein	ND		keine Mutation	3 J.	15 J.	GFR>60	0.27	-	-	ND
F25	m	Mazedonien	nein	homo	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	7 Mon.	10 Mon.	GFR>60	0.40	-	+	-

w, weiblich; m, männlich; comp hetero, compound heterozygot; homo, homozygot; del, Deletion; ins, Insertion; X, stop Codon; fs, Frameshift; GFR>60, GFR >60ml/min/1,73 m² (berechnet wie beschrieben [Schwartz et al., 1987]); CNI, Chronisches Nierenversagen (GFR <60ml/min/1,73 m²); Tx, Nierentransplantation; HWI, Harnwegsinfekt; ND, No Data; S, Strabismus; M, Myopie; A, Astigmatismus; H, Hypermetropie;

^a Die Nummerierung der DNA-Nukleotid- und Aminosäureposition bezieht sich auf EMBL/GenBank/DBJ accession Nr. AF152101. ^b Kein S-Magnesium vor Transplantation bekannt, die Diagnose wurde anhand der Klinik und der Daten der Schwester (F9-1) gestellt.

Tabelle 3.2 Manifestationssymptome

Manifestationssymptome	Patientenanzahl
Harnwegsinfekte	13/30 (43%)
Polyurie/Polydipsie	8/30 (27%)
Hämaturie	6/30 (20%)
Abakterielle Leukozyturie	5/30 (17%)
Nephrolithiasis	4/30 (13%)
Wachstumsverzögerung	4/30 (13%)
Cerebrale Krämpfe	4/30 (13%)
Bauchschmerzen	3/30 (10%)
Erbrechen/Ernährungsprobleme	3/30 (10%)
Rachitis	2/30 (7%)
Muskeltetanien	2/30 (7%)
Enuresis	1/30 (3%)
Zufallsbefund	1/30 (3%)
Untersuchung aufgrund eines betroffenen Bruders/Schwester	4/30 (13%)

3.1.2 Laborchemische Parameter

Zur Diagnose einer FHHNC gehören der Symptomenkomplex bestehend aus Hypomagnesiämie, Hyperkalziurie, bilaterale Nephrokalzinose und das Fehlen einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose. Alle betroffenen Patienten des Kollektivs zeigen erniedrigte Serummagnesiumspiegel ($<0,65$ mmol/l). Die minimalen Serummagnesiumspiegel eines jeden Patienten sind in **Tabelle 3.1** wiedergegeben. Der durchschnittliche Wert ($n=32$) liegt bei 0,40 mmol/l.

Eine Hyperkalziurie und ebenso eine Hypermagnesiurie ($n=31$) findet sich bei allen Patienten, wobei die altersabhängigen oberen Grenzwerte für Kalzium-Kreatinin- bzw. Magnesium-Kreatinin-Quotienten auf der Evaluation von Geven et al. [Geven et al., 1993] und Matos et al. [Matos et al., 1997] basieren. Im Durchschnitt ergibt sich eine maximale Kalziumausscheidung im 24-h-Sammelurin von 10,0 mg/kg ($n=27$).

Eine Hypokalziämie wird gelegentlich bei FHHNC-Patienten beschrieben. Die Mehrzahl unserer Patienten zeigen normale Serumkalziumspiegel mit Werten $>2,2$ mmol/l, acht Patienten haben niedrignormale Werte zwischen 1,8 und 2,2 mmol/l und bei acht finden sich Spiegel $<1,8$ mmol/l. Zwei der hypokalziämischen Patienten zeigten in der Neonatalperiode Zeichen von Rachitis.

3.1.3 Renale Sonographie und Nierenbiopsie

Der Nachweis einer Nephrokalzinose gehört zum klinischen Symptomenkomplex der FHHNC. In der renalen Sonographie zeigen alle Patienten des Kollektivs eine bilaterale Nephrokalzinose. Bereits zu Beginn der Erkrankung unabhängig von der vorliegenden GFR ist diese weit fortgeschritten. Charakteristisch bei ausgeprägter Nephrokalzinose

sind sonographisch nachweisbare echogene Kalzifikationen der gesamten Markpyramiden. Bei fünf der Patienten finden sich sonographisch Nierenzysten. Bei einigen wenigen Patienten wurden zu Beginn auch Röntgenaufnahmen des Abdomen angefertigt. Das typische radiologische Bild der Nephrokalzinose zeigt punkt- und stippchenförmige Ansammlungen zarter Kalkschatten in der Markregion, zu Beginn besonders im Bereich der Papillenspitzen mit evtl. Ausbildung keilförmiger Areale und seltener auch steinähnlicher Formationen.

Bei elf der Patienten ist eine Nierenbiopsie durchgeführt worden. Hier zeigen sich Kalziumablagerungen besonders medullär, fokale lymphoplasmazelluläre Infiltrationen, segmentale und globale Sklerose der Glomeruli und zum Teil unreife Glomeruli, Atrophie der Tubuli und eine mehr oder minder ausgeprägte interstitielle Fibrose.

3.1.4 Klinischer Verlauf der Erkrankung

Im Mittel beträgt die Verlaufsbeobachtung der Patienten sieben Jahre (0,5 bis 25,5 Jahre). Die klinischen Symptome, die die Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung entwickeln, sowie die laborchemischen Veränderungen sind in **Tabelle 3.3** festgehalten. Die Mehrzahl der Patienten entwickelt im Verlauf eine Polyurie und eine Polydipsie. Harnwegsinfekte sind eine häufige Komplikation und treten bei nahezu 70% der Patienten im Laufe der Erkrankung auf. Während bei Erstmanifestation etwa 13% eine Nephrolithiasis hatten, entwickeln im Verlauf 1/3 der Betroffenen symptomatische Nierensteine. Auch muskuläre Tetanien werden im Verlauf gehäuft gesehen (33%). Bei den meisten untersuchten Patienten zeigen sich eine inkomplette distal-renal-tubuläre Azidose, eine Hypozitraturie und eine Hyperurikämie.

Tabelle 3.3 Klinische und laborchemische Veränderungen erhoben während des Beobachtungszeitraums

Symptome	Patientenanzahl
Hypomagnesiämie	33/33 (100%)
Hyperkalziurie	33/33 (100%)
Nephrokalzinose	33/33 (100%)
Polyurie/Polydipsie	28/31 (90%)
Erhöhtes Serum iPTH ¹	22/25 (88%)
Inkomplette dRTA ²	17/20 (85%)
Hypozitraturie	12/15 (80%)
Harnwegsinfekte	22/32 (69%)
Hyperurikämie	18/28 (64%)
Muskeltetanien	10/30 (33%)
Nephrolithiasis	10/31 (32%)
Okuläre Anomalien	8/31 (26%)
Cerebrale Krämpfe	5/30 (17%)
Hörschädigung	0/33 (0%)

¹ iPTH, intaktes Parathormon; ² dRTA, distal-renal-tubuläre Azidose

Erhöhte Parathormonspiegel auch bei noch erhaltener Nierenfunktion sind gehäuft bei den Patienten unseres Kollektivs messbar. **Abbildung 3.1** zeigt die gemessenen Parathormonwerte (intaktes Parathormon) unserer Patienten und stellt diese Parathormonwerten eines Patientenkollektivs gegenüber, die an anderen Nierenerkrankungen leiden [Reichel et al., 1991]. Die jeweiligen Parathormonspiegel sind bezogen auf verschiedene Stadien der chronischen Niereninsuffizienz, eingeteilt in Gruppen mit verschieden stark reduzierter glomerulärer Filtrationsrate (GFR). Die Probanden des Vergleichskollektivs leiden an verschiedenen Glomerulonephritiden, vaskulärer/hypertensiver Nephropathie, Diabetes mellitus, chronischer Pyelonephritis und/oder Refluxnephropathie. Auffällig ist hier, dass FHHNC-Patienten im gleichen Stadium einer chronischen Niereninsuffizienz vergleichsweise höhere Parathormonspiegel zeigen als Patienten, die aufgrund einer anderen Erkrankung niereninsuffizient wurden. Bereits FHHNC-Patienten mit normaler Nierenfunktion ($GFR > 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) zeigen im Vergleich mit gesunden Probanden erhöhte Parathormonwerte. Der Mittelwert liegt für den jeweiligen Bereich einer Nierenfunktionseinschränkung deutlich über dem der Patienten mit anderen Nierenerkrankungen (**Abbildung 3.1**). Erhöhte Serumparathormonspiegel früh im Verlauf der Erkrankung unabhängig von der Nierenfunktion (GFR) wurden bereits zuvor beschrieben [Praga et al., 1995].

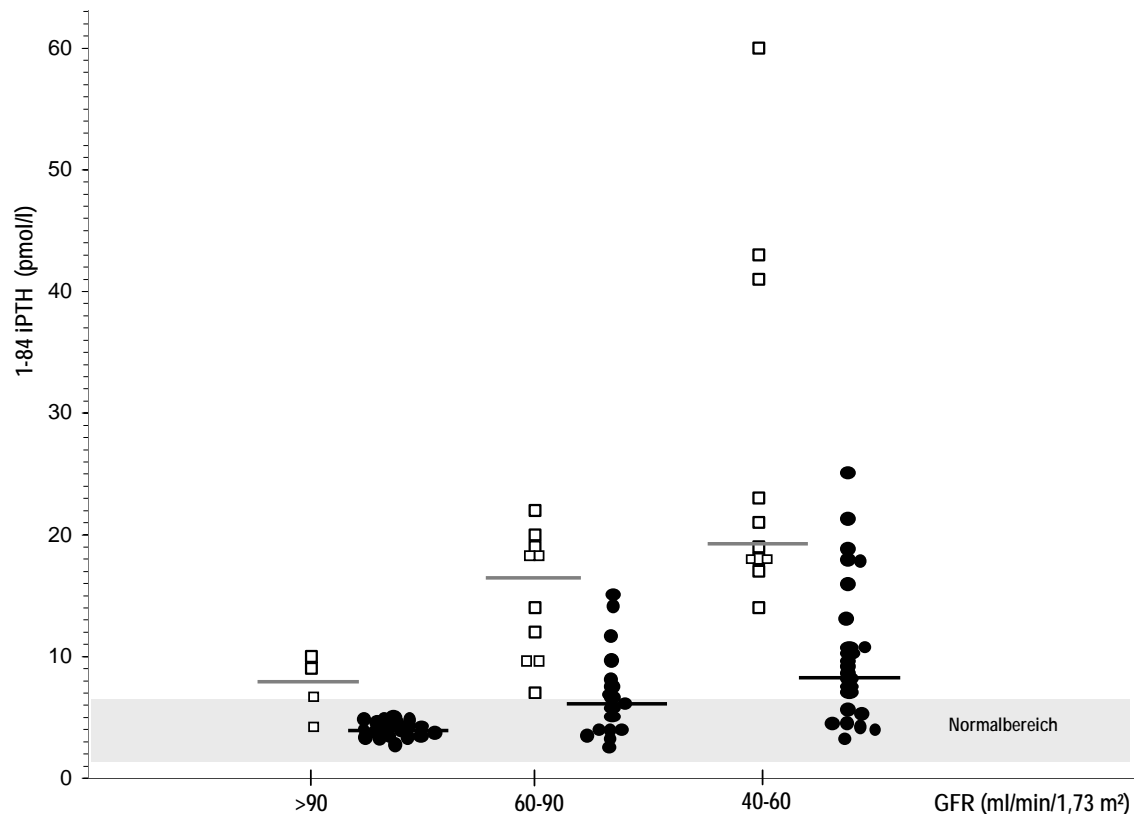


Abbildung 3.1 Vergleich der Parathormonwerte von FHHNC-Patienten mit anderen Patienten, die an unterschiedlichen Nierenerkrankungen leiden, bezogen auf die Einschränkung der Nierenfunktion (GFR-Rate). Parathormon gemessen als intaktes Parathormon; Normalwert: 1,2 -6,0 pmol/l. Parathormonspiegel von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankung (verschied. Glomerulonephritiden, vaskulärer/hypertensiver Nephropathie, Diabetes mellitus, chronischer Pyelonephritis und/oder Refluxnephropathie) bei verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz (schwarze Punkte) [Reichel et al., 1991] und Parathormonspiegel der FHHNC-Patienten bei verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz (weiße Quadrate). Probanden und FHHNC-Patienten mit normaler Nierenfunktion (GFR >90 ml/min/1,73 m²); 60-90, beginnende chronische Niereninsuffizienz (GFR =60-90 ml/min/1,73 m²); 40-60, milde chronische Niereninsuffizienz (GFR =40-60 ml/min/1,73 m²). Der Mittelwert jeder Gruppe ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet.

3.1.5 Nierenfunktion in Abhängigkeit der Dauer der Erkrankung

Als im Rahmen der Diagnosestellung die erste Bestimmung der Nierenfunktion bei den Patienten erfolgt ist, haben bereits elf eine chronische Niereninsuffizienz mit einer GFR <60 ml/min/1,73 m². Sieben Patienten haben eine GFR >80 ml/min/1,73 m² und dreizehn eine GFR von 60-80 ml/min/1,73 m². Für zwei Patienten liegen keine Daten vor (Patientin F9-1 und Patient F9-1).

Am Ende des Beobachtungszeitraumes sind bereits zwölf der 33 Patienten (36%) terminal niereninsuffizient, acht davon sind bereits transplantiert, vier befinden sich in einem Dialyseprogramm. Das mediane Alter bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz liegt bei 14,5 Jahren (5,5 bis 37,5 Jahre). Weitere elf Patienten (33%)

leiden an chronischer Niereninsuffizienz mit einer GFR <60 ml/min/1,73 m², während bei zehn Patienten (31%) weiterhin eine GFR >60 ml/min/1,73 m² erhalten ist.

Der Verlauf der Nierenfunktion in unserem Kollektiv von FHHNC-Erkrankten zeigt über den Beobachtungszeitraum von sieben Jahren eine deutliche Abnahme der GFR. Eine so deutliche und rasche Nierenfunktionsverschlechterung ist bei anderen hereditären Tubulopathien bisher nicht beschrieben. Der Therapieansatz mit Magnesiumsalzen, um den renalen Magnesiumverlust auszugleichen und die Verabreichung von Thiaziddiuretika, um die renale Kalziumausscheidung zu reduzieren, scheint den Prozess des Nierenfunktionsverlustes nicht aufhalten zu können. Jedoch ist auffällig, dass der Verlauf der Nierenfunktion sehr variabel ist und es nicht bei allen Patienten gleich schnell zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Nierenfunktion kommt. **Abbildung 3.2** zeigt den Verlauf der Nierenfunktion für die Patienten unseres Kollektivs (n=30) anhand der GFR. Für die Patienten F9-1, F9-2 und F11 liegen keine Daten zum Verlauf der GFR vor. Patient F8-1 zeigt z.B. eine rasche Abnahme der GFR innerhalb kürzester Zeit, beginnend mit einer GFR von 33 ml/min/1,73 m² im Alter von drei Jahren bei Manifestation der Erkrankung und Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz innerhalb von 2,5 Jahren. Einige der Patienten erleben einen ähnlich rasch progredienten Verlauf, wenn auch nicht ganz so rasant wie bei Patient F8-1. Im Vergleich hierzu sind die Patientinnen F1-2 und F2-1 erst sehr spät terminal niereninsuffizient geworden (mit 34 Jahren und respektive 37,5 Jahren). Einige weitere Patienten zeigen am Ende des Beobachtungszeitraumes einen sehr stabilen Verlauf der Nierenfunktion, z.B. das Geschwisterpaar F5-1 und F5-2, F12 und F18.

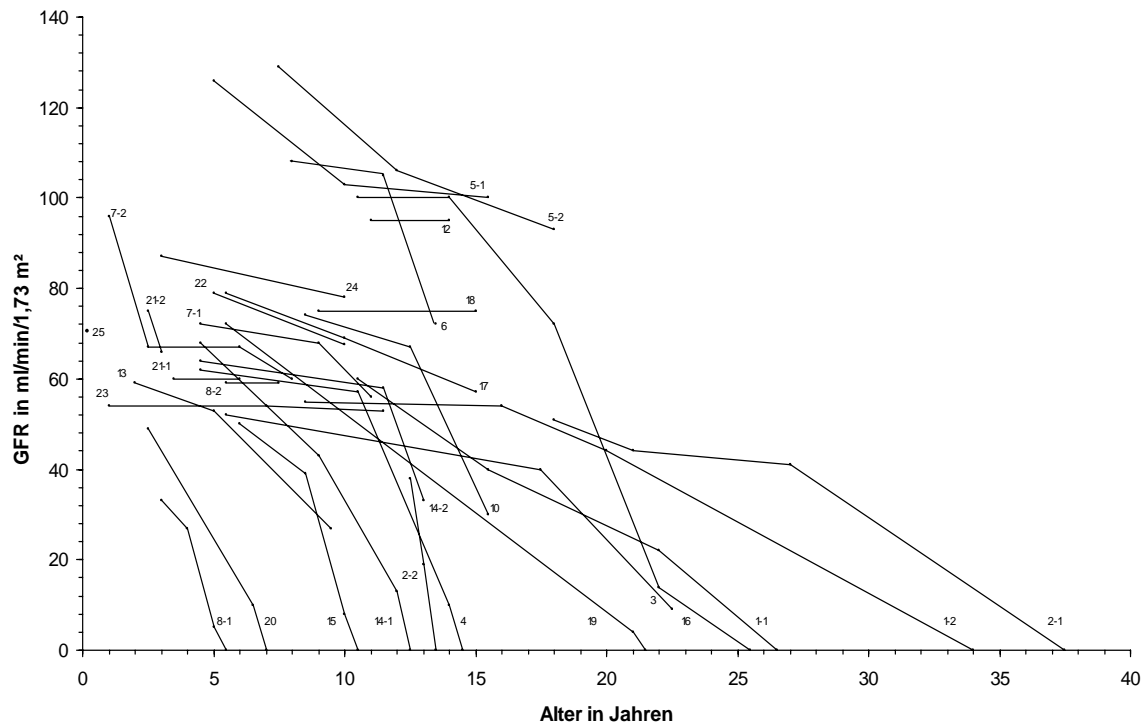


Abbildung 3.2 Verlauf der GFR von 30 FHHNC-Patienten (keine Daten für F9-1, F9-2 und F11). Die GFR wurde wie beschrieben berechnet [Schwartz et al., 1987]. Bei Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz wurde bei allen Patienten eine Nierenersatztherapie begonnen (Dialyse oder Transplantation).

3.2 Genotypisierung der Patienten

3.2.1 Mutationsanalyse

Die Analyse von Mutationen im CLDN16-Gen erfolgte mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (single-strand conformational polymorphism analysis, SSCP oder SSCA) und anschließender direkter Sequenzierung.

Für das Kollektiv der vorliegenden Arbeit ergeben sich bei den 25 Familien 15 verschiedene Mutationen in der Gensequenz von CLDN16, die das kodierende Protein verändern (**Tabelle 3.1**). Alle gefundenen Mutationen kosegregieren mit dem Phänotyp und keine Mutation konnte in 100 Kontrollchromosomen nachgewiesen werden. Bei 31 Patienten finden sich Mutationen auf beiden Allelen, davon zeigen 18 Patienten homozygote Mutationen und 13 Patienten compound heterozygote Mutationen. Bei Patient F19 konnte nur eine heterozygote Splice-Site-Mutation gefunden werden, obwohl die gesamte kodierende Region und die benachbarten Intron-Sequenzen analysiert wurden. Patientin F24 zeigt keine Mutation im CLDN16-Gen.

In unserem Kollektiv finden sich vierzehn neue Mutationen im Vergleich zu den zuvor publizierten Mutationen von Simon et al. [Simon et al., 1999] und acht neue Mutationen im Vergleich zu den bereits 2000 publizierten Mutationen von F1-F8 [Weber et al., 2000]. Fünf dieser neuen Mutationen sind Punktmutationen mit Folge eines einfachen Aminosäureaustausches, eine Frameshift-Mutation (Leserasterverschiebung) mit vorzeitigem Abbruch der Translation und zwei Splice-Site-Mutationen.⁵

In **Abbildung 3.3** ist das Claudin-16-Protein mit den aus den verschiedenen Mutationen resultierenden Aminosäureveränderungen dargestellt. Betrachtet man alle Allele, die eine Mutation aufweisen, so betreffen 67% (31 von 46) einen Aminosäureaustausch in der ersten extrazellulären Schleife von Claudin-16. Vergleiche der Aminosäuresequenz von Claudin-16 mit anderen Mitgliedern der Claudin-Familie zeigen hier eine besonders große Sequenzübereinstimmung. Vier verschiedene Mutationen im Bereich der ersten extrazellulären Schleife (Leu145Pro, Arg149Leu, Leu151Thr und Leu151Phe) betreffen Aminosäurepositionen, die innerhalb der Claudin-Familie stark konserviert sind.

Auffällig ist das gehäufte Vorkommen der Mutation Leu151Phe (48% der mutierten Allele). Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels Haplotypen-Analyse mit Mikrosatellitenmarkern, die das CLDN16-Gen flankieren, und der Analyse eines im Intron des CLDN16-Gens gelegenen Polymorphismus den Verdacht auf einen gemeinsamen Vorfahren aller Patienten mit einer Leu151Phe Mutation erhärten („Founder Effekt“).

Bei drei Familien des Kollektivs findet sich eine Frameshift-Mutation, die eine Aminosäure in Position 55 betrifft. Die frameshift-Mutation entsteht durch den Ersatz von zwei Guanin-Basen durch ein einzelnes Cytosin. Dies führt zu einem Abbruch des Proteins vor der ersten transmembranen Domäne, indem es eine Nonsense-Aminosäuresequenz von der Aminosäureposition 55 bis 89 induziert, gefolgt von einem TGA-Stoppcodon an Position 90. Auffällig ist, dass zusätzlich zu dieser frameshift-Mutation, eine weitere Mutation auf dem selbem Allel nur weiter in Richtung COOH-Terminus vorliegt. Zwei Mutationen auf dem selbem Allel sind aber sehr ungewöhnlich. Eine Analyse von 72 Kontrollchromosomen zeigte für die Frameshift-Mutation an Position 55 eine Häufigkeit von 16,7 %. Folglich lässt sich ein gewöhnlicher Polymorphismus eher denn eine pathogenetisch wirksame Mutation vermuten. Wie bereits Simon et al. anführte, zeigt Claudin-16 im Gegensatz zu anderen Claudinen, deren intrazellulärer NH₂-Terminus nur 6 bis 7 Aminosäuren lang ist, einen

⁵ Mutationsanalysen von acht Familien (F1-F8) des in dieser Arbeit vorgestellten Patientenkollektivs wurden bereits 2000 publiziert [Weber et al., 2000].

zytoplasmatischen NH₂-Terminus von 73 Aminosäurenlänge [Simon et al., 1999]. Claudin-16 besitzt ein zweites Methionin mit einer passenden Kozak-Konsensussequenz an Position 71 analog zum Startbeginn anderer Claudine, sodass möglicherweise *in vivo* die Translation erst hier beginnt und sich damit die Frameshift-Mutation an Position 55 im nicht translatierten Bereich befindet.

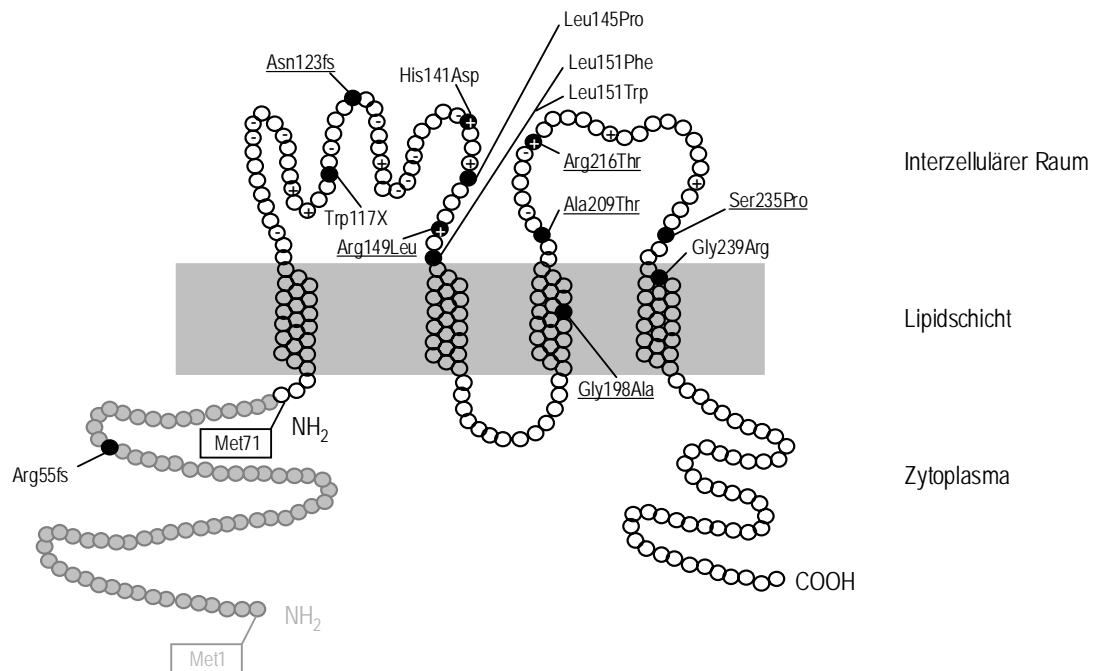


Abbildung 3.3 Proteinmodell von Claudin-16 (Aminosäurereste abgebildet als Kreise, die Lipidschicht der Zellmembran ist grau dargestellt, intrazellulärer NH₂- und COOH-Terminus). Aminosäurereste, die in Folge der in unserem Kollektiv gefundenen Mutationen im CLDN16-Gen verändert sind, sind schwarz dargestellt (Neue Mutationen sind unterstrichen). Die zwei neuen Splice-Site Mutationen sind nicht gezeigt. Geladene Aminosäuren (Wildtyp) in den extrazellulären Schleifen sind markiert. Die oben genannten Ergebnisse der Mutationsanalyse und Sequenzvergleiche mit anderen Claudinen sprechen dafür, dass Claudin-16 kürzer ist, als zuvor angenommen, daher sind die ersten 70 Aminosäuren des NH₂-Terminus und das Methionin an Position 1 grau markiert. Der eigentliche Translationsbeginn (Methionin 71) ist markiert.

3.2.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation und intrafamiliäre Variabilität

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse für das CLDN16 Gen wurden mit den klinischen Daten der Patienten verglichen. Eine eindeutige Beziehung zwischen Geno- und Phänotyp lässt sich dabei jedoch nicht erkennen. Eine Beziehung zwischen einer bestimmten Mutation und einem besonders schwerwiegenden bzw. leichteren Verlauf der Erkrankung, die einen Rückschluss auf die Bedeutsamkeit dieser Mutation für das Protein ergibt, ist nicht ersichtlich.

Wie bereits zuvor dargestellt, ist der Verlauf der Nierenfunktion sehr variabel mit einer Mehrzahl rasch progredienter Verläufe. Eine Korrelation zwischen Nierenfunktionsverlauf und bestimmten Mutationen scheint aber nicht zu existieren. Ein Vergleich der Träger der homozygoten Leu151Phe Mutation untereinander zeigt für drei Betroffene (F14-1, F14-2 und F13) einen eher rasch progredienten Verlust der Nierenfunktion, während bei den anderen Patienten (F7-1, F7-2, F17, F18, F22 und F25) ein eher moderater oder sogar stabiler Verlauf vorliegt. Andere Mutationen lassen sich aufgrund der geringen Anzahl schlecht miteinander vergleichen.

Auf der anderen Seite fällt bezüglich des Verlaufs der Nierenfunktion eine weitgehende intrafamiliäre Konkordanz auf. So zeigen die Geschwister von F5 einen milden Verlauf, die Geschwisterpaare F1, F7 und F21 einen moderaten Verlauf und die Patientinnen der Familie F14 (eineiige Zwillinge) einen eher schweren Verlauf (**Abbildung 3.2**). Eine solche intrafamiliäre Konkordanz lässt sich für die Familien F2 und F8 allerdings nicht nachweisen. Patientin F2-1 ist erst mit 37 Jahren terminal niereninsuffizient geworden, der Bruder (F2-2) bereits mit 13,5 Jahren. Wie bereits oben erwähnt, ist der Verlust der Nierenfunktion bei Patient F8-1 rasant mit dem Beginn der Dialyse im Alter von 5,5 Jahren, während bei seiner Schwester am Ende des Beobachtungszeitraumes mit acht Jahren eine stabile Nierenfunktion mit einer GFR von 60 ml/min/1,73 m² vorliegt. Ein valider Vergleich lässt sich allerdings bei unterschiedlichem Alter zum Zeitpunkt der Studie nicht ziehen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem Verlauf der Nierenfunktion lässt sich nicht herstellen.

Bezüglich weiterer Symptome ergibt sich keine Beziehung zwischen Geno- und Phänotyp. Extrarenale Manifestationen der Erkrankung wie okuläre Anomalien, lassen sich nicht gehäuft bei bestimmten Mutationen nachweisen. Die Wahrscheinlichkeit bezüglich des Auftretens eines Harnwegsinfektes oder von Nierensteinen lässt sich nicht in Beziehung setzen mit bestimmten Mutationen.

3.3 Familienuntersuchung

3.3.1 Klinische Charakterisierung

Im Rahmen der Familienuntersuchung zeigt sich ein gehäuftes Auftreten von Nephrolithiasis, Nephrokalzinose, rezidivierenden Harnwegsinfekten und/oder Hyperkalziurie in der Anamnese oder bei den durchgeführten Untersuchungen im Rahmen der Studie bei ansonsten gesunden Familienangehörigen, wie es bereits andere Autoren beschrieben haben [Praga et al., 1995]. Ein gehäuftes Auftreten einer Markschwammniere, wie Praga et al. beschrieb, findet sich in unserem Kollektiv nicht. Insgesamt wurden 23 Familien in die klinische Charakterisierung eingeschlossen. Zur Familie F9 konnten keine klinischen Daten gewonnen werden, bei Familie F11 konnten weder klinische noch genetische Daten erhoben werden, da es sich um ein adoptiertes Kind handelt. Nephrolithiasis, Nephrokalzinose, rezidivierende Harnwegsinfekte und/oder Hyperkalziurie finden sich bei 56% (13 von 23) der Familien, wobei eine Nephrolithiasis von den im Fragebogen erfassten klinischen Daten am häufigsten ist. Insgesamt wurden 64 erst- und zweitgradige Familienangehörige anhand der von den jeweiligen pädiatrischen Zentren zur Verfügung gestellten Fragebögen (Kapitel 2.1.2; Originalfragebogen im Anhang) klinisch charakterisiert. Für vier Familienangehörige besteht nur der anamnestische Hinweis auf eine Symptomatik. So ergibt die Anamnese des Großvaters mütterlicherseits in Familie F19 und der Großmutter und des Onkels mütterlicherseits in Familie F22 eine Nephrolithiasis. Eine weitere klinische Untersuchung der jeweiligen Angehörigen ist aber nicht möglich, da der Großvater mütterlicherseits in Familie F19 und die Großmutter mütterlicherseits in Familie F22 bereits verstorben sind und der Onkel mütterlicherseits in Familie F22 einer weiteren klinischen Untersuchung nicht zugänglich ist. Auch die Schwester in Familie F4 ist zum Zeitpunkt der Studie bereits verstorben. Anamnestisch lag bei ihr eine Nephrokalzinose vor. Ob es sich hier um eine FHHNC-Erkrankte handelt oder eine symptomatische heterozygote Mutationsträgerin, lässt sich somit nicht klären. Die genannten vier symptomatischen Familienangehörigen konnten auch keiner molekulargenetischen Untersuchung zugeführt werden.

Symptomatische Familienangehörige im Sinne der Studie und deren genetische Daten bezüglich einer Mutation im CLDN16-Gen sind in **Abbildung 3.4** dargestellt.

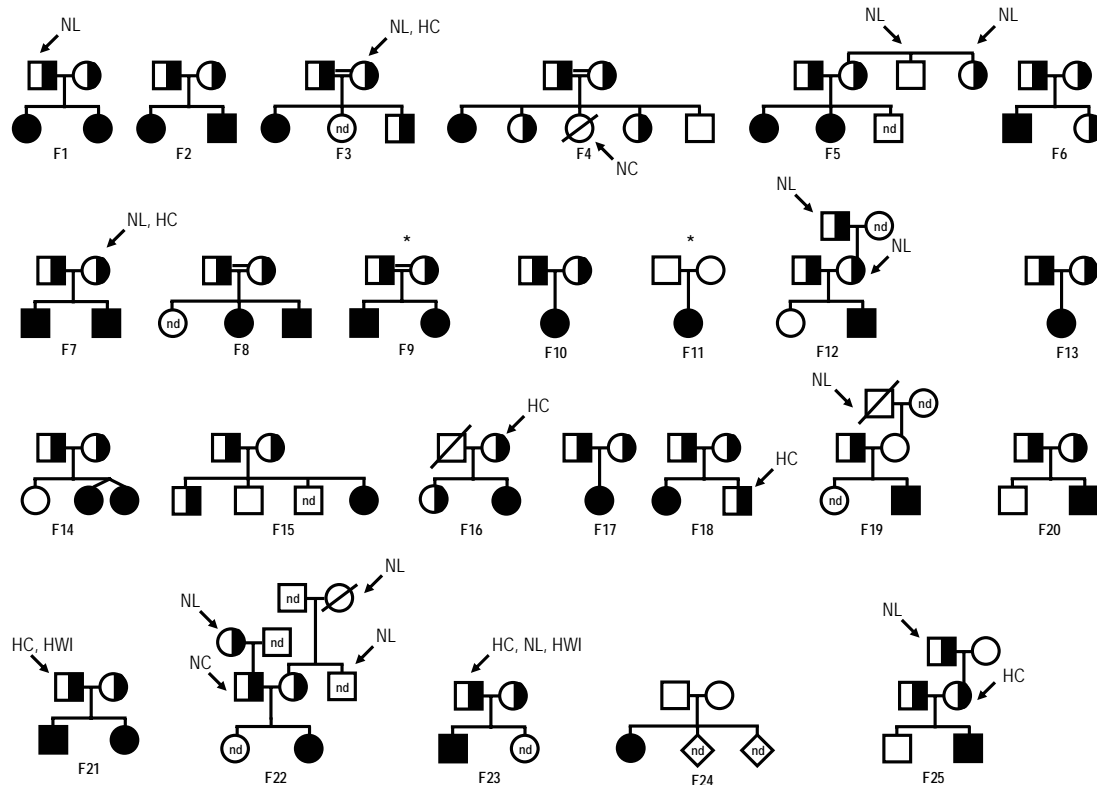


Abbildung 3.4 Ergebnisse der Familienuntersuchung für Familie F1 bis F25. Familienangehörige, die von Hyperkalziurie (HC), Nephrolithiasis (NL), Nephrokalzinose (NC) und/oder rezidivierenden Harnwegsinfekten (HWI) betroffen sind, sind durch Pfeile markiert. Schwarz ausgefüllte Symbole stellen betroffene Patienten und zur Hälfte schwarz gefüllte Symbole stellen heterozygote Mutationsträger dar. Kreise stehen für weibliche und Quadrate für männliche Personen. Ein Doppelbalken markiert Konsanguinität. Verstorbene Familienmitglieder sind durch einen Schrägstrich durch das Symbol gekennzeichnet. Familienmitglieder, von denen keine Blutprobe erhalten werden konnte, sind durch nd (no data) markiert. Zwei Familien konnten nicht untersucht werden, diese sind mit * gekennzeichnet.

3.3.2 Genetische Charakterisierung

Die Familienuntersuchung beinhaltet eine genetische Charakterisierung des für die FHHNC-Erkrankung verantwortlichen CLDN16-Gens. Ein Screening auf CLDN16-Mutationen erfolgte mit SSCP (single-strand conformation polymorphism) Analyse. SSCP-Analysen wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, 4°C und 15°C. Um mittels PCR die kodierende CLDN16-Sequenz (Exon 1-5) genomischer DNA zu amplifizieren, wurden überlappende Primer verwendet, passend zur Sequenz des humanen CLDN16-Gens. Die Primer-Sequenzen sind in **Tabelle 3.4** dargestellt. Amplifizierte Genprodukte wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Exone mit Konformationsveränderungen wurden direkt sequenziert (Kapitel 2.1.2 Vorgehensweise der genetischen Untersuchung).

Tabelle 3.4 Primer-Sequenzen für SSCP und Sequenzierung des CLDN16-Gens

Primer Name	Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer
h-claudin-16ex1a	1	CTCAGCCCTTGCACTGACCTG	CACTTAAGTGGCGGGTGTCTAGTC
h-claudin-16ex1b	1	GTATTTTCACATTGCCAGGTACCAG	CAACAGTCAGTCCAGGTGGCCAC
h-claudin-16ex1c	1	TGTCTGCCCATGTTGCCATCCTG	TTAGCGAAAATTTGGGCTGGCCTG
h-claudin-16ex2	2	GAATTGTTTACACGGTGTCTTCTC	CAAGCAGTGAGCTCTAAGGCATACGTAC
h-claudin-16ex3	3	TGACTTTTACCGAGGGGTGTG	CCTACCCCTGTTGCTAGTCCAG
h-claudin-16ex4	4	TCCCCTATTATTTGTAGCATCCTC	GGGAAAAACGATAGTGGAGGCAAG
h-claudin-16ex5	5	TTCCCAAGTCACTGAGTTCTAC	TCTAAATAACTGTTCTGGATTGAC

Tabelle 3.5 fasst die gesamten genetischen und klinischen Daten der Familienangehörigen zusammen. Insgesamt sind 66 Familienangehörige einer molekulargenetischen Untersuchung zugeführt worden. Die Eltern in Familie F9 sind heterozygot für eine CLDN16-Mutation, konnten aber klinisch nicht untersucht werden, sodass insgesamt 64 Familienangehörige klinisch wie genetisch charakterisiert wurden. Für die Eltern der betroffenen FHHNC-Patienten konnten jeweils passend eine heterozygote Mutation, die die Patienten homozygot oder compound heterozygot zeigen, nachgewiesen werden. In Familie F16 konnte der Vater nicht untersucht werden, da er bereits verstorben ist. Die Mutter zeigt heterozygot die splice site Mutation, sodass der Vater vermutlich die Leu151Phe Mutation trug. Auch die Eltern von Patientin F11 wurden nicht untersucht, da es sich um ein adoptiertes Kind handelt. Obwohl die gesamte codierende Region und die benachbarten Intron-Sequenzen analysiert wurden, findet sich für die Mutter der Familie F19 keine Mutation. Für den betroffenen Patient der Familie F19 ist nur eine splice-site-Mutation nachgewiesen worden. Für die Eltern in Familie F24 ergibt sich ebenso wie für ihre Tochter keine Mutation im CLDN16-Gen, sodass es sich hier möglicherweise um eine andere Entität handelt. Die Eltern und die zwei Schwestern der Familie F4 zeigen heterozygot die Gly239Arg-Mutation, aber auf gleichem Allel die frameshift-Mutation, die eine Aminosäure in Position 55 betrifft (Arg55fs). Wahrscheinlich handelt es sich, wie bereits oben diskutiert (Kapitel 3.1.6), um einen gewöhnlichen Polymorphismus eher denn eine pathogenetisch wirksame Mutation.

Von den genetisch wie klinisch untersuchten erst- und zweitgradigen Angehörigen (n=64) sind 53 (83%) heterozygot und für elf (17%) konnte keine Mutation nachgewiesen werden, obwohl die gesamte codierende Region und die benachbarten Intron-Sequenzen analysiert wurden. Von den 64 genetisch wie klinisch untersuchten Personen sind fünfzehn (23%) symptomatisch und 49 (76%) zeigen am Ende des Beobachtungszeitpunktes keine klinischen Symptome im Sinne des Fragebogens.

Betrachtet man alle symptomatischen Personen, so sind 93% (vierzehn von fünfzehn) heterozygot für CLDN16-Mutationen. Nur der Onkel mütterlicherseits in Familie F5 leidet an Nephrolithiasis, eine CLDN16-Mutation wurde bei ihm aber nicht nachgewiesen. Für symptomatische Familienangehörige ergibt sich klinisch kein Hinweis auf eine Erkrankung an FHHNC und im CLDN16-Gen wurde keine homozygote oder compound heterozygote Mutation gefunden.

Ein Zusammenhang zwischen einzelnen Mutationen und einer vorhandenen Symptomatik ergibt sich nicht. Ein gehäuftes Auftreten von z.B. Hyperkalziurie oder Nephrolithiasis bei einer bestimmten Mutation ist nicht zu verzeichnen, sodass eine Korrelation zwischen dem Phänotyp heterozygoter CLDN16-Mutationsträger und einer bestimmten Mutation sich nicht herleiten lässt. Betrachtet man alle symptomatischen Angehörigen und die jeweilige Mutation im CLDN16-Gen, so wird erkennbar, dass nahezu bei jeder gefundenen Mutation unseres Kollektivs zumindest ein symptomatischer heterozygoter Mutationsträger existiert (**Tabelle 3.5**).

Auch eine intrafamiliäre Konkordanz bezüglich symptomatischer heterozygoter CLDN16-Mutationsträger ergibt sich nicht.

Tabelle 3.5 Klinische und genetische Daten der Familienangehörigen^a

Familie	Angehörige	Zygotität	Nukleotidaustausch	Konsequenz d. Mutation	Symptomatik
F1	Vater	hetero	350(TGG→TAG)	Trp117X	NL
F1	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F2	Vater	hetero	453(TTG→TGG)	Leu151Trp	
F2	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F3	Vater	hetero	593(GGT→GCT)	Gly198Ala	NL, HC
F3	Mutter	hetero	593(GGT→GCT)	Gly198Ala	
F3	Schwester	ND			
F3	Bruder	hetero	593(GGT→GCT)	Gly198Ala	
F4	Vater	hetero-(hetero)	715(GGA→AGA)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	Gly239Arg-(Arg55fs)	
F4	Mutter	hetero-(hetero)	715(GGA→AGA)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	Gly239Arg-(Arg55fs)	
F4	Schwester	hetero-(hetero)	715(GGA→AGA)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	Gly239Arg-(Arg55fs)	
F4	Schwester	verstorben			NC
F4	Schwester	hetero-(hetero)	715(GGA→AGA)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	Gly239Arg-(Arg55fs)	
F4	Bruder	keine Mutation			
F5	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F5	Mutter	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	
F5	Bruder	ND			
F5	Onkel ms	keine Mutation			NL
F5	Tante ms	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	NL
F6	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F6	Mutter	hetero	715(GGA→AGA)	Gly239Arg	
F6	Schwester	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F7	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F7	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	NL, HC
F8	Vater	hetero-(hetero)	421(CAT→GAT)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	His141Asp-(Arg55fs)	
F8	Mutter	hetero-(hetero)	421(CAT→GAT)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	His141Asp-(Arg55fs)	
F8	Schwester	ND			
F9	Vater	hetero	646/647(CGT→ACT)	Arg216Thr	ND
F9	Mutter	hetero	646/647(CGT→ACT)	Arg216Thr	ND
F10	Vater	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	
F10	Mutter	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	
F11	adoptiert	ND			
F12	Vater	hetero-(hetero)	453(TTG→TTT)-[165/166 del(GG)→ins(C)]	Leu151Phe-[Arg55fs]	
F12	Mutter	hetero	625(GCT→ACT)	Ala209Thr	NL
F12	Schwester	keine Mutation			
F12	Großvater ms	hetero	625(GCT→ACT)	Ala209Thr	NL
F12	Großmutter ms	ND			
F13	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F13	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F14	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F14	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F14	Schwester	keine Mutation			
F15	Vater	hetero	446(CGA→CTA)	Arg149Leu	
F15	Mutter	hetero	446(CGA→CTA)	Arg149Leu	
F15	Bruder	hetero	446(CGA→CTA)	Arg149Leu	
F15	Bruder	keine Mutation			
F15	Bruder	ND			
F16	Vater	verstorben	vermutl. 453(TTG→TTT)	vermutl. Leu151Phe	
F16	Mutter	hetero	785-14(T→G)	Splice-Site-Mutation	HC
F16	Schwester	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F17	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F17	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F18	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F18	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F18	Bruder	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	HC
F19	Vater	hetero	325-5(T→G)	Splice-Site-Mutation	
F19	Mutter	keine Mutation			
F19	Schwester	ND			
F19	Großvater ms	verstorben			NL
F19	Großmutter ms	ND			
F20	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F20	Mutter	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	
F20	Bruder	keine Mutation			
F21	Vater	hetero	368del(A)	Asn123fs	HC, HWI
F21	Mutter	hetero	434(CTG→CCG)	Leu145Pro	
F22	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	NC
F22	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F22	Schwester	ND			
F22	Großmutter vs	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	NL
F22	Großvater vs	ND			
F22	Onkel ms	ND			NL
F22	Großvater ms	ND			
F22	Großmutter ms	verstorben			NL
F23	Vater	hetero	703(TCC→CCC)	Ser235Pro	HC, NL, HWI
F23	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F23	Schwester	ND			
F24	Vater	keine Mutation			
F24	Mutter	keine Mutation			
F24	2 Geschwister	ND			
F25	Vater	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	
F25	Mutter	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	HC
F25	Bruder	keine Mutation			
F25	Großvater ms	hetero	453(TTG→TTT)	Leu151Phe	NL
F25	Großmutter ms	keine Mutation			

ms, mütterlicherseits; vs, väterlicherseits; hetero, heterozygot; del, Deletion; ins, Insertion; X, stop Codon; fs, Frameshift; ND, No Data; NL, Nephrolithiasis; HC, Hyperkalziurie; NC, Nephrokalzinose; HWI, Harnwegsinfekt

^a Die Nummerierung der DNA-Nukleotid- und Aminosäureposition bezieht sich auf EMBL/GenBank/DDBJ accession Nr. AF152101.

4 Diskussion

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung von Patienten, die an familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) leiden, einer seltenen hereditären Erkrankung mit renalem Magnesiumverlust. Mutationen im CLDN16-Gen, welches für das renale Tight Junction Protein Claudin-16 kodiert, konnten als ursächlicher genetischer Defekt bei FHHNC-Patienten identifiziert werden [Simon et al., 1999].

Die phänotypische Beschreibung dieser Patienten soll eine bessere und schnellere Diagnosestellung und eine Abgrenzung zu anderen Magnesiumverlusterkrankungen ermöglichen. Hereditäre Störungen der Magnesiumhomöostase stellen nur einen kleinen Teil von Störungen im Magnesiumstoffwechsel dar, aber anhand dieser seltenen erblichen Erkrankungen können Einblicke in die Magnesiumphysiologie gewonnen werden. In jüngster Zeit konnte nicht nur für FHHNC der zu Grunde liegende Gendefekt identifiziert werden, sondern eine Vielzahl von weiteren Genen und deren Proteine, die an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichen es, die Transport- und Regulationsvorgänge von Magnesium auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

An die Darstellung des Phäno- und Genotyps der FHHNC-Patienten in Kapitel 3 schließt sich nun die Einordnung der Ergebnisse in ein Gesamtkonzept an. Dies soll in drei Abschnitten geschehen. Zunächst wird die Analyse der klinischen Daten mit besonderem Augenmerk auf das Fortschreiten der Niereninsuffizienz im Vergleich anderer Erkrankungen dargestellt. Im zweiten Abschnitt erfolgt eine Analyse der genetischen Daten mit einer anschließenden Phänotyp-Genotyp-Gegenüberstellung. Molekulare Mechanismen von Mutationen im CLDN16-Gen, die mit FHHNC assoziiert sind, sowie strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Claudin-16 werden im Zusammenhang neuer Forschungsergebnisse diskutiert. Abschließend werden die Ergebnisse der klinischen und genetischen Charakterisierung der Familienuntersuchung in die Genetik hyperkalziurischer Nephrolithiasis eingeordnet.

4.1 Analyse der Patienten-Phänotypisierung

Die Phänotypisierung der betroffenen Patienten zeigt, dass die Erkrankung sich meist bereits in der frühen Kindheit manifestiert. Die häufigsten Symptome bei Manifestation sind rezidivierende Harnwegsinfekte, Polyurie/Polydipsie, Hämaturie und abakterielle Leukozyturie. In den zuvor veröffentlichten kleineren klinischen Studien und einzelnen Fallberichten (Kapitel 1.2.1) haben sich ähnliche Symptome in unterschiedlicher Häufung gezeigt. In unserem Kollektiv liegt das mediane Alter bei Manifestation der ersten Symptome bei 3,5 Jahren (n=30). Häufig zeigt sich eine gewisse Latenz von den ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung. Kari et al. fanden bei sieben Patienten ein mittleres Alter von 1,5 Jahren bei Manifestation der Erkrankung und bei Diagnosestellung von 5,9 Jahren [Kari et al., 2003]. Die häufig erst spät gestellte Diagnose ist möglicherweise durch die nicht routinemäßige Bestimmung des Serummagnesiumspiegels und die Seltenheit der Erkrankung zu erklären.

Die endgültige Diagnose einer FHHNC-Erkrankung wird aufgrund der Trias Hypomagnesiämie, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose gestellt. Alle Patienten der Studie zeigen wie erwartet eine Hypomagnesiämie, aber meist ein normales Serumkalzium mit Tendenz zur Hypokalziämie, ein gut bekanntes Phänomen. Erhöhte iPTH-Werte und die geringere Abhängigkeit der Kalziumhomöostase vom parazellulären Transportweg könnten vielleicht den normalen Kalziumspiegel bei FHHNC-Patienten erklären [Quamme, 1997]. In unserem Kollektiv sehen wir erhöhte PTH-Spiegel unabhängig von der renalen Funktion und schon bevor eine chronische Niereneinschränkung eintritt, was auch von anderen Autoren beobachtet wurde [Praga et al., 1995; Konrad et al., 2008]. Die erhöhten PTH-Werte vor Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz können durch den massiven Kalziumverlust und der dadurch folgenden Kalziummobilisation aus dem Knochen erklärt werden. Zusätzlich ist die Hypomagnesiämie ein Stimulus für PTH-Sekretion [Quamme und de Rouffignac, 2000]. Allerdings bildet eine sehr schwere Hypomagnesiämie die Ausnahme, da in diesem Fall ein eher inhibitorischer Effekt auf die PTH-Sekretion vorzuliegen scheint [Rodríguez-Soriano et al., 1987]. Dies wird z.B. bei Patienten mit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie (HSH) gehäuft beobachtet. Bei diesen Patienten ist trotz Hypokalziämie PTH häufig stark erniedrigt [Shalev et al., 1998]. Aber die Magnesiumspiegel bei HSH-Patienten sind auch deutlich niedriger als bei FHHNC-Patienten.

Eine zweite Erklärung für die meist normalen Kalziumspiegel bei FHHNC-Patienten könnte in einer möglichen Kompensation durch erhöhte intestinale Resorption liegen. Außerdem erfolgt in der Niere die Rückresorption von Kalzium ins medulläre Interstitium bei FHHNC wahrscheinlich über transzellulären Transport durch TRPV5 („transient receptor potential vanilloid channel 5“) Kalzium-Kanäle im DCT und den Sammelrohren [Hoenderop et al., 2003; Magaldi et al., 1989], sodass die Kalziumhomöostase vom parazellulären Transportweg geringer abhängig zu sein scheint.

Claudin-16-defiziente knockdown-Mäuse wiesen eine Nephrokalzinose auf [Hou et al., 2007]. Die pathophysiologischen Veränderungen dieser Mäuse sind denen von FHHNC-Patienten sehr ähnlich: trotz der erhöhten Kalziumausscheidung ist das Serumkalzium normal. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration wird durch Niere, Darm und Knochen über calcitrope Hormone wie PTH und Vitamin D3 geregelt. Die knockdown-Mäuse hatten normale PTH-Werte, aber erhöhte Vitamin D3-Spiegel und unter kalziumarmer Diät waren Knochenmineralgehalt und Knochendichte reduziert. Wahrscheinlich wird in diesem Claudin-16-defizienten Mausmodell der renale Kalziumverlust über eine Erhöhung von Vitamin D3 mit folgender intestinaler Resorptionssteigerung von Kalzium ausgeglichen [Hou et al., 2007].

Die erhöhten iPTH-Werte bei FHHNC-Patienten waren unabhängig von der GFR, aber korrelierten gut mit dem verzögerten Knochenalter der Patienten [Wolf et al., 2002]. Eine Wachstumsverzögerung bei angeborenen Tubulopathien unabhängig von der GFR wurde bereits gezeigt [Haffner et al., 1999] und ist für FHHNC typisch [Blanchard et al., 2001; Kuwertz-Bröking et al., 2001]. Calcitriolgaben bei erhöhten iPTH-Werten (iPTH >100 pg/ml) und Kalziumsubstitution bei niedrigem Serumkalzium sind wichtig, um einer Wachstumsverzögerung entgegenzuwirken. Durch Therapie mit Calcitriol/Cholecalciferol in Kombination mit Kalzium und Hydrochlorothiazid konnte ein Aufholen des Skelettalters und des Wachstumsrückstandes gezeigt werden, sowie eine Verminderung der iPTH-Werte [Wolf et al., 2002].

4.1.1 Rasches Fortschreiten der Niereninsuffizienz – ein typisches Merkmal der FHHNC

In unserem Kollektiv zeigt sich bei Diagnosestellung bereits bei 33% der Patienten eine deutlich eingeschränkte Nierenfunktion mit einer $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Am Ende des Beobachtungszeitraumes sind bereits 36% der Patienten terminal niereninsuffizient

und weitere 33% zeigen eine $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Eine rasche Verschlechterung der Nierenfunktion und das Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz in der ersten oder zweiten Lebensdekade wurde bei FHHNC-Patienten häufig beobachtet [Praga et al., 1995] und scheint im Gegensatz zu anderen erblichen Tubulopathien ein typisches Merkmal dieser Erkrankung zu sein. Etwa ein Drittel der Patienten wird bereits in der Adoleszenz terminal niereninsuffizient und benötigt eine Nierenersatztherapie. Auffällig ist aber eine starke Variabilität bezüglich der Progression der Nierenfunktion in unserem Kollektiv. Einige Patienten zeigen eine stabile Nierenfunktion mit normaler GFR noch in der zweiten Lebensdekade, während andere Patienten bereits in der frühen Kindheit terminal niereninsuffizient sind. Einen ethnischen Hintergrund, wie Kari et al. in einer kleinen Fallstudie vermuteten [Kari et al., 2003], lässt sich in unserem Kollektiv mit Patienten aus Europa und dem afrikanischen Kontinent nicht bestätigen.

Eine Erklärung für den durch progredientes Nierenversagen komplizierten Verlauf der FHHNC-Erkrankung ist bisher nicht gelungen. Die pathophysiologische Grundlage, die zum Nierenversagen führt, ist unklar. Der Verlust oder die gestörte Funktion von Claudin-16 scheint im TAL zu einer geminderten Reabsorption von Magnesium zu führen, woraus ein ausgeprägter Magnesiumverlust über die Niere und in der Folge eine schwere Hypomagnesiämie entsteht [Simon et al., 1999]. Die Transportsysteme von Kalzium und Magnesium im TAL sind miteinander gekoppelt und die Reabsorption beider divalenter Kationen erfolgt über den parazellulären Weg [Quamme, 1997]. Daraus kann gefolgert werden, dass der renale Defekt mit Magnesiumverlust ebenso die Kalziumausscheidung betrifft und eine Assoziation zwischen der erhöhten Magnesium- und der erhöhten Kalziumausscheidung existiert. Inaktivierende Mutationen im CLDN16-Gen führen zu einer Störung der renal-tubulären Reabsorption von Magnesium und Kalzium, wie es typisch für FHHNC-Patienten ist [Simon et al., 1999]. Blanchard et al. lieferten die ersten funktionellen Daten bei FHHNC-Patienten und zeigten, dass die parazelluläre Magnesium- und Kalziumreabsorption im TAL tatsächlich selektiv bei diesen Patienten gestört ist, während die tubuläre NaCl-Reabsorption intakt ist [Blanchard et al., 2001].

Auf verschiedene Faktoren, die eine Rolle im raschen Fortschreiten der Niereninsuffizienz bei FHHNC-Patienten spielen könnten, soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

4.1.2 Welche Faktoren spielen eine Rolle in der Entwicklung von Nephrokalzinose und Nephrourolithiasis?

Die Hyperkalziurie scheint eine entscheidende Rolle in der pathophysiologischen Entstehung von Nephrokalzinose und der renalen Steinbildung zu spielen. Zusätzlich zeigen FHHNC-Patienten eine verminderte Urinausscheidung von Ziträt, einem bekannten Inhibitor renaler Steinbildung [Manz et al., 1978; Ulmann et al., 1985], aber orale Ziträtgaben schienen keinen klaren positiven Einfluss auf die Progression der Niereninsuffizienz zu haben [Praga et al., 1995].

In früheren Beschreibungen der FHHNC-Erkrankung konnte die Einschränkung der Nierenfunktion und damit das Stadium der chronischen Niereninsuffizienz mit der Progression der tubulointerstitiellen Nephropathie und der assoziierten Nephrokalzinose korreliert werden [Rodriguez-Soriano et al., 1987; Praga et al., 1995]. Daher wurde lange Zeit die progrediente tubulointerstitielle Nephropathie der begleitenden Hyperkalziurie und Nephrokalzinose zugeschrieben und bisherige therapeutische Ansätze zielten auf die Reduktion der Hyperkalziurie ab, um damit das Fortschreiten der Nephrokalzinose und folglich der Niereninsuffizienz aufzuhalten.

Obwohl Hyperkalziurie unabhängig von der zu Grunde liegenden Erkrankung ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Nephrokalzinose ist, ist Hyperkalziurie weder die alleinige Ursache noch eine Voraussetzung. So wird bei Patienten mit idiopathischer Hyperkalziurie nicht gehäuft eine Nephrokalzinose beobachtet [Wrong, 1998]. Nephrokalzinose bezieht sich auf die Ablagerung von Kalzium in der Niere und Urolithiasis auf Steine im Harntrakt, aber es besteht gehäuft eine Koinzidenz von Beidem [Mandel, 1996; Alon, 1997]. Idiopathische Hyperkalziurie ist eine der häufigsten metabolischen Veränderungen, die mit Urolithiasis assoziiert ist [Moxey-Mims und Stapleton, 1993]. Andere Faktoren, die zu Nephrourolithiasis führen können, beinhalten erhöhte Urinausscheidung von Oxalaten und Uraten oder die verminderte Ausscheidung von Inhibitoren der Kristallisierung wie Ziträt und Magnesium oder Makromolekülen wie Nephrocalcin, Uropontin und Osteopontin [Shiraga et al., 1992; Worcester et al., 1992]. Auch das Urinvolumen und der Säurebasen-Status beeinflussen die Kristallisierungstendenz oben genannter Ionen. Schädigung von Nierengewebe durch Hypoxie, Hypertension und nephrotoxischen Substanzen spielen bei der Initiierung von Nephrokalzinose eine Rolle [Adams und Rowe, 1992; Moxey-Mims und Stapleton, 1993]. Obwohl die ätiologischen Faktoren, die zu Nephrokalzinose und Nephrolithiasis führen, ähnlich sind, ist nicht klar, durch welche Faktoren das eine oder

andere bevorzugt entsteht. Bei FHHNC-Patienten könnten die erhöhte Kalziumausscheidung, der Magnesiummangel und die Ansäuerungsdefekte in der Gesamtheit bei der Entwicklung einer Nephrokalzinose und einer Nephrourolithiasis eine Rolle spielen.

Zur Reduktion der Hyperkalziurie werden Thiazide in der Therapie der FHHNC eingesetzt, da bei verschiedenen Entitäten gezeigt werden konnte, dass Hydrochlorothiazid eine Hyperkalziurie reduzieren kann [Velazquez, 1987; Coe et al., 1988; Reinhardt et al., 1995; Raja et al., 2002]. Die Funktionsweise von Thiaziddiuretika besteht in einer Erhöhung der renalen Natriumausscheidung durch Blockierung des Na^+/Cl^- -Kotransporters (NCCT), der in der apikalen Membran des DCT lokalisiert ist. Dadurch kommt es als Konsequenz des reduzierten extrazellulären Volumens zu einer erhöhten Natriumreabsorption im proximalen Tubulus, die wiederum zu einer Stimulation des parazellulären Kalziumtransportes führt, sodass der hypokalziurische Effekt von Hydrochlorothiazid vermutlich durch eine erhöhte passive Reabsorption von Kalzium im proximalen Tubulus hervorgerufen wird [Nijenhuis et al., 2005]. Akut erhöht Hydrochlorothiazid zwar die Magnesiumaufnahme dosisabhängig [Dai et al., 1997], aber chronischer Hydrochlorothiazidgebrauch induziert eine Hypokaliämie durch vermehrten Kaliumverlust im Urin. Hypokaliämie führt wiederum zu einem renalen Magnesiumverlust [Quamme, 1997; Dai et al., 1997]. Bei NCCT-knockout-Mäusen, einem Tiermodell des Gitelman-Syndroms, kommt es begleitend zu einer Down-Regulation des epithelialen Magnesiumkanals TRPM6 in der apikalen Membran des DCT, was einen Mechanismus in der Pathogenese von Hypomagnesiämie bei NCCT-Inhibition (durch Thiazide) bzw. Inaktivierung darstellen könnte [Nijenhuis et al., 2005].

Der Einfluss der Therapie auf den Verlauf der Nierenfunktion wird kontrovers in der Literatur diskutiert. Praga et al. berichteten, dass weder die Gabe von Magnesium den Serummagnesiumspiegel noch eine Thiazidtherapie die Ausscheidung von Kalzium im Urin normalisierten oder die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie verzögerten [Praga et al., 1995]. Während einige Publikationen von einer gewissen Verzögerung in der Langzeitverschlechterung der Nierenfunktion und der Verhinderung rachitischer Skelettveränderungen durch die frühe Gabe von Hydrochlorothiazid berichten [Mourani et al., 1999], sehen die Mehrheit der Studien keinen Effekt auf die Progression der Erkrankung und das Fortschreiten der Niereninsuffizienz durch Thiazide. Meist gelang zwar eine Reduktion der Hyperkalziurie im Sinne signifikant reduzierter

Kalzium/Kreatinin-Quotienten, aber die Kalzium/Kreatinin-Quotienten korrelierten nicht mit der Progression der Niereninsuffizienz oder der Wachstumsverzögerung [Kuwertz-Bröking et al., 2001; Zimmermann et al., 2006].

Die Gewichtung der Therapie auf die Reduktion der Hyperkalziurie entstand durch die ursprüngliche Vermutung, dass die Hyperkalziurie eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Nephrokalzinose spielt. Letztlich reduzierte eine Therapie mit Thiaziden zwar die Hyperkalziurie, schien aber nicht die Progression der Niereninsuffizienz aufzuhalten [Wolf et al., 2002]. Es stellt sich daher die Frage, ob der Schweregrad der Nephrokalzinose mit dem Grad der Nierenfunktionseinschränkung tatsächlich korreliert. Bereits andere Autoren stellten diese Hypothese in Frage, da viele andere Erkrankungen, die mit einer frühzeitigen Nephrokalzinose einhergehen, nicht durch eine deutliche Verschlechterung der Nierenfunktion gekennzeichnet sind [Konrad und Weber, 2003; Lee NP et al., 2006]. Die Ätiologie einer Nephrokalzinose in der frühen Kindheit bei konsanguinen Familien beinhaltet neben FHHNC im Wesentlichen vier angeborene rezessive Erkrankungen: primäre Hyperoxalurie, distal-renal-tubuläre Azidose (dRTA), angeborene hyperphosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie (HHRH) und Hyperprostaglandin-E-Syndrom/antenatales Bartter-Syndrom (HPS/aBS) [Vargas-Poussou et al., 2008]. Patienten mit primärer Hyperoxalurie Typ I zeigen wie FHHNC-Patienten eine klinische Heterogenität in der Ausprägung der Erkrankung, wobei es bei manchen Patienten sehr früh zu einer rasch progredienten Niereninsuffizienz kommt, während andere keine wesentliche Einschränkung der Nierenfunktion vorweisen [Hoppe et al., 1997]. Im Besonderen ähnelt die dRTA der FHHNC-Erkrankung, unterscheidet sich aber im Langzeitverlauf erheblich. Bei früher Diagnose und adäquater Therapie hat die dRTA im Vergleich mit der FHHNC-Erkrankung eine gute Prognose mit Erhalt der Nierenfunktion [Wrong, 1998]. Beim Hyperprostaglandin-E-Syndrom/antenatales Bartter-Syndrom ist die GFR trotz schwerer Nephrokalzinose in der Regel nicht eingeschränkt [Köckerling et al., 1996]. Auch bei Dent's Disease (X-gebundene Nephrolithiasis) korrelierte die Schwere der Nephrokalzinose nicht mit dem Grad der Niereninsuffizienz [Knohl und Scheinman, 1994]. Bei FHHNC-Patienten variiert der Grad der Niereninsuffizienz sehr stark, obwohl alle Patienten von einer schweren medullären Nephrokalzinose betroffen sind. Zusammenfassend führen folglich Tubulopathien, die mit einer Nephrokalzinose einhergehen, nicht zwangsläufig zum progredienten Nierenversagen. Die Gefahr der

Niereninsuffizienz ist hauptsächlich ein Merkmal der zu Grunde liegenden Erkrankung und nicht eine einfache Komplikation der Nephrokalzinose [Wrong, 1998].

4.1.3 Claudin-16 – ein wichtiges Strukturprotein

Da die Progression der Niereninsuffizienz nicht abhängig vom Ausmaß der Nephrokalzinose ist, müssen noch andere bisher nicht identifizierte Faktoren eine Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz bei FHHNC-Patienten spielen. Von besonderem Interesse in dieser Hinsicht ist die bei japanischen schwarzen Rindern natürlich vorkommende autosomal rezessive chronisch interstitielle Nephritis mit diffuser zonaler Fibrose (CINF), auch renale tubuläre Dysplasie genannt. Für diese Erkrankung konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie mit zwei verschiedenen großen Deletionen im CLDN16-Gen assoziiert ist [Hirano et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Ohba et al., 2000; Hirano et al., 2002]. CINF ist durch Nierenversagen innerhalb der ersten sechs Monate und Wachstumsretardierung gekennzeichnet. Der Genlokus konnte auf dem bovinem Chromosom 1q31-33 lokalisiert werden [Kobayashi et al., 2000; Ohba et al., 2000], welches zu humanem Chromosom 3q syntenisch ist. Eine Deletion von Exon eins bis vier oder eine Deletion von Exon zwei bis vier mit zusätzlicher Deletion von 21bp von Exon 5 bei bovinem CLDN16 sind beschrieben [Hirano et al., 2000; Ohba et al., 2000; Hirano et al., 2002]. Claudin-16 wird wie beim Menschen bei gesunden Tieren in der Niere im TAL exprimiert. Detaillierte pathoanatomische Studien bei diesen Rindern konnten eine abnorme Nephronentwicklung mit unreifen Glomeruli und Tubuli zeigen [Okada et al., 2005]. Diese histologischen Veränderungen in boviner Niere lassen vermuten, dass es sich um einen Defekt in der Differenzierung von renalen tubulären Epithelzellen handelt. Claudin-16 scheint also außer dem Transport von divalenten Kationen weitere spezifische Funktionen zu besitzen. Ein intaktes CLDN16-Gen mag eine wichtige Rolle in der Erhaltung der strukturellen Integrität von tubulointerstitiellen Proteinen spielen mit einer zusätzlichen Rolle für die Differenzierung von renalen Tubulussegmenten. Dieses natürlich vorkommende bovine Knockout-Modell spricht dafür, dass der komplette Verlust von Claudin-16 assoziiert ist mit einer schweren Einschränkung der Nierenfunktion, während die heterozygote Deletion asymptomatisch bleibt. Im Gegensatz zur humanen Erkrankung (FHHNC) haben die Mutationen bei CINF einen totalen Funktionsverlust zu Folge, welcher den schwereren Phänotyp mit obligatem Nierenversagen und Tod in den ersten sechs Monaten bedingen könnte. Beim Menschen sind keine solchen großen CLDN16-Gen-

Deletionen beschrieben. Es ist möglich, dass das mutierte Claudin-16-Protein bei FHHNC partiell die Integrität der renalen Epithelstruktur deorganisiert, während der komplette Funktionsverlust von CLDN16-Protein in CINF die komplette Zerstörung hervorruft.

Wie kann die terminale Niereninsuffizienz bei Patienten mit CLDN16-Mutationen erklärt werden? Tubulointerstitielle Fibrose, charakterisiert durch Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und tubulärer Atrophie, ist der allgemein anerkannte gemeinsame Weg am Ende einer terminalen Niereninsuffizienz [Iwano und Neilson, 2004; Liu, 2004; Zeisberg und Kalluri, 2004]. In unserer Patientenkohorte wurde bei 11 Patienten eine Nierenhistologie durchgeführt und dokumentiert. Diese zeigte Kalziumablagerungen, Glomerulosklerose, unreife Glomeruli, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose in einem variablen Ausmaß. Bei boviner CLDN16-assoziiierter interstitieller Nephritis wurden tubuläre Epithelzellen als unreif mit Verlust von Polarisation und Haftung an der Basalmembran beschrieben [Kobayashi et al., 2000]. Es zeigt sich eine Assoziation zwischen Fibrose und abnormen Tubuli und der Begriff „renal tubuläre Dysplasie“ betont die zugrunde liegenden Störungen der renal tubulären Epithelzellen [Sasaki et al., 2002]. Diese Merkmale finden sich bei „epithelialer zu mesenchymaler Transformation (EMT)“, ein Prozess bei dem tubuläre Epithelzellen zu neuen Fibroblasten transformiert werden [Lee DB et al., 2006]. Diese Fibroblasten sollen eine Hauptrolle in der Progression der renalen Fibrose spielen. EMT ist charakterisiert durch einen Verlust von Zell-Zell-Kontakten und apikobasaler Zellpolarität, kennzeichnend für eine defekte Funktion von Tight Junctions. Bei EMT findet sich eine Transformation von stationären Epithelzellen zu migratorischen mesenchymalen Fibroblasten-ähnlichen Zellen [Lee DB et al., 2006]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Zerstörung von Tight Junctions ein erstes Ereignis bei EMT ist. Die Induktion von EMT *in vitro* ist assoziiert mit einer Down-Regulation von Claudinen und Occludin, den Hauptkomponenten des Tight Junction Komplexes [Ikenouchi et al., 2003]. Hypothetisch könnte ein Defekt der Claudin-16-Funktion ein erstes Ereignis in der Zerstörung des Tight Junction Komplexes sein, gefolgt von Veränderungen der Zellpolarität und einer Induktion von tubulärer Dysplasie [Konrad et al., 2008]. Dies ist ein Hinweis, dass Tight Junctions, evtl. aber auch Claudine selbst, für die strukturelle Integrität von Epithelverbänden wichtig sind. Vorstellbar ist, dass Mutationen in diesen Bereichen eben nicht nur zu einer Reabsorptionsstörung von Elektrolyten führen, sondern auch der Aufbau des

Tubulusapparates gestört wird. Ein Argument hierfür sind die Knockout-Rinder, die bereits bei Geburt eine verminderte Anzahl an Einzelnephronen zeigen und außerdem scheinbar auch eine Differenzierungsstörung haben, erkennbar an der großen Zahl unreifer Glomeruli und Tubuli.

4.2 Analyse der Patienten-Genotypisierung

Die Analyse des Genotyps zeigt außer für drei Allele CLDN16 Mutationen in allen mutierten Allelen unseres Kollektivs. Insgesamt konnten fünfzehn verschiedene Mutationen nachgewiesen werden, wobei sich vierzehn neue Mutationen im Vergleich zu den von Simon et al. publizierten zehn Mutationen ergeben [Simon et al., 1999] und acht neue Mutationen im Vergleich zu den bereits 2000 publizierten Mutationen von F1-F8 [Weber et al., 2000]. Elf Mutationen unseres Kollektivs sind Punktmutationen mit Folge eines einfachen Aminosäureaustausches im fertigen Protein. Zusätzlich zeigen sich zwei Frameshift-Mutation (Leserasterverschiebung) mit vorzeitigem Abbruch der Translation und zwei Splice-Site-Mutationen.

Bis heute sind mehr als 30 Mutationen im CLDN16-Gen bekannt [Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Weber et al., J Am Soc Nephrol. 2001 Sep; Blanchard et al., 2001; Müller et al., 2003; Tajima et al., 2003; Kang et al., 2005; Kutluturk et al., 2006; Müller et al., Hum Mol Genet, 2006; Müller et al., J Clin Endocrinol Metab, 2006; Türkmen et al., 2006; Staiger et al., 2007; Sanjad et al., 2007; Konrad et al., 2008]. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um Punktmutationen mit dem Austausch einer einzelnen Aminosäure im Claudin-16 Protein. Einige dieser Mutationen sind zum Teil mit einem besonderen Phänotyp assoziiert [Türkmen et al., 2006; Sanjad et al., 2007], wobei es sich eher um eine Koinzidenz von FHHNC und anderen kongenitalen Missbildungen [Türkmen et al., 2006] bzw. Minderwuchs [Sanjad et al., 2007] zu handeln scheint.

4.2.1 Founder-Effekt für die Mutation Leu151Phe

Eine auffällige Häufung in unserem Kollektiv zeigt sich für die Mutation Leu151Phe. Diese Punktmutation betrifft 48% der mutierten Allele in unserem Patientenkollektiv. Die Familien, die von einer Leu151Phe-Mutation betroffen sind, stammen gehäuft aus dem östlichen Teil Deutschlands bzw. Osteuropas (Polen, Tschechische Republik, Slowenien, Bosnien-Herzegowina oder Mazedonien). Vierzehn dieser achtzehn

Familien besitzen diese Mutation auf mindestens einem Allel, während in keiner der Familien aus Frankreich, Algerien, Tunesien oder Türkei die Leu151Phe-Mutation beobachtet wird. Diese Beobachtung lässt zunächst vermuten, dass es sich bei dem Leu151Phe-Austausch um eine besonders wichtige Aminosäure des Claudin-16-Proteins handelt und der Austausch eine Art „hot spot“ für Mutationen darstellt. Andererseits wird diese Mutation, trotz der auffälligen Häufung in unserem Kollektiv, von Simon et al. in seiner Studie von zehn Familien, die aus Spanien, Großbritannien, Italien, Ägypten, Saudi Arabien und Sri Lanka stammten, nicht beschrieben [Simon et al., 1999]. Folglich spricht die Häufung der Leu151Phe-Mutation in unserem Kollektiv eher für einen gemeinsamen Vorfahren als Träger dieser Mutation im Sinne eines „Founder-Effekts“. Eine Haplotypen-Analyse von fünf Mikrosatellitenmarkern und eine Untersuchung eines im Gen liegenden Polymorphismus dieser Familien konnten einen Founder-Effekt bestätigen [Weber et al., J Am Soc Nephrol., 2001 Sep].

4.2.2 Kontroverse um den Translationsbeginn von Claudin-16 –

Interspezies-Sequenzvergleiche von Claudin-16

In drei Familien zeigt ein mutiertes Allel eine Leserasterverschiebung, die den Aminosäurerest Arg55 betrifft, aber zusätzlich noch eine Punktmutation in Richtung 3' der Nukleotidsequenz auf dem selben Allel. Obwohl zwei Mutationen auf einem betroffenen Allel auch für andere erbliche Erkrankungen beschrieben wurden [Lemmink et al., 1998], ist es doch ungewöhnlich. Die Arg55fs Mutation betrifft den N-Terminus des Proteins und entsteht durch eine Deletion von zwei Guaninresten (G165/G166) und Insertion nur eines Cytosinrestes (C165). Somit entsteht ein vorzeitiges Stoppcodon an Position 90. Daraus folgt, dass alle zusätzlichen Mutationen weiter in Richtung 3' Ende nicht krankheitsverursachend sein können.

Kozak [Kozak, 1996] beschrieb spezifische Nukleotidsequenzen, die das Methionin kodierende Startcodon ATG umgeben, welches für die Einleitung der Translation verantwortlich ist. Auffällig ist, wie bereits Simon et al. diskutierten [Simon et al., 1999], dass das CLDN16-Gen ein zweites Methionin an Position 71 (Met71) besitzt, welches im Kontext einer passenderen Kozak-Konsensussequenz liegt als das erste Methionin (Met1). Das zweite Methionin, 70 Aminosäuren weiter in Richtung 3' Ende zum Ersten, liegt auffallender Weise analog zum Translationsbeginn anderer Claudine [Morita et al., 1999; Furuse et al., 1998]. Möglicherweise ist dieses zweite Methionin der eigentliche Beginn der Translation. Hierfür spricht, dass die Untersuchung an 72

Kontrollchromosomen eine Häufigkeit der G165/G166 Deletion und C165 Insertion von 16,7% (12 von 72 Kontrollchromosomen) ergibt. In einer Kontrollperson zeigt sich dieser Polymorphismus sogar homozygot, ohne die Erkrankung zu verursachen. Die hohe Prävalenz in einer gesunden Kontrollgruppe unterstützt die Hypothese, dass die G165/G166 Deletion und C165 Insertion im nicht translatierten 5'-Bereich der CLDN16 mRNA liegt und die zugrunde liegende Nukleotidsequenz nicht kodierend ist. Die Hypothese, dass Claudin-16 um 70 Aminosäuren kürzer ist und das Methionin an Position 71 der eigentliche Translationsbeginn ist, findet eine weitere Unterstützung in Sequenzvergleichen von CLDN16 innerhalb verschiedener Spezies. Die cDNA Sequenzen von Maus und Ratte zeigen einen passenden Translationsbeginn, der zu humanem Methionin an Position 71 korrespondiert, während ein in Richtung 5' gelegener Start bei Beiden fehlt [Weber et al., J Am Soc Nephrol. 2001 Dec]. Die Nukleotidsequenzen von Nagetier und Mensch sind ab dem passenden Translationsbeginn sehr homolog, während die Sequenz weiter 5' sehr stark variiert. Das CLDN16-Gen von Nagetieren kodiert für ein Protein mit 235 Aminosäuren Länge und im Vergleich zur humanen Aminosäuresequenz fehlen die ersten 70 Aminosäuren. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz zeigen Ratte und Maus eine 99%ige Homologie, und zur humanen Aminosäuresequenz (Met71-Val305) eine 92%ige und respektive eine 91%ige Homologie [Weber et al., J Am Soc Nephrol. 2001 Dec].

Für bovines CLDN16 findet sich in der Genbank ein 235 (GenBank accession no. AB035210) und ein 254 (GenBank accession no. AB030082) Aminosäuren langes Protein, wobei das Kürzere zu dem von Maus und Ratte zu 88% homolog ist [Weber et al., J Am Soc Nephrol. 2001 Dec]. Bovines und humanes CLDN16 haben mehr als ein Startcodon in einer passenden Kozak-Konsensussequenz, teilen sich aber nur ein passendes Methionin, nämlich humanes Met71 und bovines Met1 (GenBank accession no. AB035210) und danach folgt eine sehr homologe Aminosäuresequenz (91% Homologie) [Weber et al., J Am Soc Nephrol. 2001 Dec]. Die Claudin-16-Aminosäuresequenzen von Maus und Ratte besitzen ein passendes Methionin zu bovinem Met1, respektive humanem Met71. Die Sequenz in Richtung 3' ist bei allen vier Spezies sehr ähnlich, was auf eine evolutionäre Konservierung der Sequenz schließen lässt. Aber alle vier Spezies unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz Richtung 5'.

Die Interspezies-Vergleiche der CLDN16-Sequenz unterstützen die Theorie, dass sich humanes CLDN16 den kurzen N-Terminus mit Nagetier und Rind, sowie den anderen

Claudinen teilt. Folglich scheint das zweite Methionin an Position 71 der eigentliche Beginn der Translation zu sein.

Einen neuen Hinweis, dass Methionin 71 der eigentliche Beginn der Translation ist, liefern Expressionsstudien in verschiedenen epithelialen Zelllinien [Hou et al., 2005]. Versuche, das komplette Claudin-16 (Met1-Val305) in den Zelllinien zu exprimieren, führten zu einer nur geringen Expression und Claudin-16 fand sich nicht in den Tight Junctions der Plasmamembran. Währenddessen konnte das kürzere Protein (Met71-Val305) stabil in der Plasmamembran exprimiert werden.

Einige neuere Publikationen beziehen sich auf Claudin-16 als ein 235 Aminosäuren langes Protein und sehen das Methionin an Position 71 als das relevante Startcodon an. Daher wird von einigen Autoren die entsprechende Aminosäure, die von einer Mutation im CLDN16 Gen betroffen ist, mit der Anzahl von Aminosäuren -70 gekennzeichnet. Zum Beispiel die Mutation Thr233Arg [Müller et al., 2003] entspricht Thr303Arg, bezieht man sich auf die komplette Proteinsequenz (Met1-Val305). Wenn sich im folgenden Text auf Mutationen aus solchen Publikationen bezogen wird, sollen diese der Publikation entsprechend gekennzeichnet werden. Von den bisher beschriebenen Mutationen gibt es nur wenige, die sich im aminoterminalen intrazellulären Teil des Proteins befinden. Mutationen, die das Met71 betreffen, sind keine einfachen Punktmutationen, sondern vielmehr Mutationen mit Verlust des Startcodons [Sanjad et al., 2007; Konrad et al., 2008].

4.2.3 Claudine sind wichtige Komponenten für Struktur und Funktion von Tight Junctions

Die Existenz von separaten Kompartimenten unterschiedlicher Ionen und molekularer Zusammensetzung ist elementar für einen multizellulären Organismus. Die Kompartimente werden durch Epithelien begrenzt, welche einen regulierten Austausch zwischen apikaler und basolateraler Oberfläche durch transzellulären und parazellulären Transport ermöglichen. Tight Junctions (TJs) bilden die Barriere des parazellulären Weges.

Claudin-16 gehört zur multigenen Claudin-Familie von transmembranen Proteinen. Die Claudin-Familie beim Menschen besteht aus mindestens 24 Mitgliedern und die meisten Claudine zeigen eine gewebe- und segmentspezifische Verteilung [Furuse und Tsukita, 2006]. Zusätzlich verändert sich das Expressionsmuster der Claudine während der Ontogenese z.B. in den Nierentubuli [Holmes et al., 2006] und erklärt so die

entwicklungsbedingte Regulation von renalen Epitheltransporteigenschaften [Reyes et al., 2002].

Mitglieder der Claudin-Familie sind neben Occludin die Hauptkomponenten von Tight Junctions in verschiedenen Zellen. Alle Claudine (~20-28 kD) besitzen wie Occludin (~65 kD) vier transmembrane Domänen und einen zytosolischen N- und C-Terminus und teilen sich eine ähnliche Membrantopologie mit Occludin [Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999]. Tight Junctions bilden Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Zellen, indem sie zirkumferente Gürtel um Epithel- und Endothelzellen in der apikalen Region der lateralen Zellmembran in vielen Organen bilden. Elektronenmikroskopisch korrespondieren diese Kontakte zu kontinuierlichen und verzweigten Fibrillen von transmembranen Partikeln, die den apikalen Zellpol der lateralen Oberfläche jeder Zelle umgeben [Mitic et al., 2000]. Fibrillen der einen Zelle interagieren mit den Fibrillen der benachbarten Zelle, um den parazellulären Raum zu schließen und so die parazellulären Permeabilitätscharakteristika eines jeden Epithels zu bestimmen. Diese Fibrillen werden von mindestens zwei Typen von transmembranen Proteinen geformt, Occludin und den Mitgliedern der Claudin-Familie. Claudine besitzen die intrinsische Fähigkeit zu linearen Fibrillen zu polymerisieren und können Occludin in diese Fibrillen rekrutieren [Furuse et al., 1998]. Unterhalb der Fibrillen findet sich ein dichtes zytoplasmatisches Netzwerk von Proteinen. Diese Proteine und deren Interaktionen scheinen das Gerüst der transmembranen Proteine zu sein [Mitic et al., 2000]. Die meisten Claudine kodieren ein C-terminales postsynaptic density 95/discs large/zonula occludens-1 (PDZ)-Domäne bindendes Motiv, welches mit der PDZ-Domäne von Gerüstproteinen wie z.B. Zonula Occludens (ZO) Proteinen interagieren kann [Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1999; Turksen und Troy, 2004]. Diese zytosolischen membranassoziierten Gerüstproteine der ZO-Familie (ZO-1, ZO-2 und ZO-3) verbinden die transmembranen TJ-Proteine mit dem Aktinzytoskelett und rekrutieren Signalmoleküle zur Region der Zell-Zell-Kontakte [Gonzalez-Mariscal et al., 2000]. Die Interaktion der TJ-Proteine mit dem Aktinzytoskelett ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität und der Barrierefunktion der TJs [Anderson und Van Itallie, 1995]. Claudine binden an die erste PDZ-Domäne von ZO-1 [Itoh et al., 1999]. Die peripheren Membranproteine wie ZO-1 spielen eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung von Claudinen in TJs von polarisierten Zellen [Umeda et al., 2006] und sind für die Funktionalität der Claudine unabdingbar. Die C-terminale Threonin-Arginin-Valin-(TRV)-Sequenz von Claudin-16 kodiert für ein funktionelles Typ 1 PDZ-

Bindungsmotiv und interagiert spezifisch mit der PDZ-Domäne von ZO-1, nicht ZO-2 oder ZO-3 [Müller et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Claudin-16 und ZO-1 die renale Reabsorption von divalenten Kationen erhöht [Ikari et al., 2004]. Viele weitere Proteine wurden an der zytoplasmatischen Seite von Tight Junctions lokalisiert, sodass ein komplexes Proteinnetzwerk den transmembranen Proteinen unterliegt [Mitic et al., 2000].

4.2.4 Funktionen von Tight Junctions

Tight Junctions sind dynamische Mikrostrukturen und in viele wichtige zelluläre Funktionen involviert [Lee DB et al., 2006]. Tight Junctions besitzen drei Hauptfunktionen: 1. als „Tor“ funktionieren sie wie eine regulatorische Barriere, um biologische Flüssigkeitskompartimente unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander zu trennen; 2. als „Zaun“ generieren sie die apikobasale Zellpolarität des Epithels, um so den transepithelial gerichteten Transport, der typisch für Epithelzellen ist, zu gewährleisten; 3. bilden Tight Junction Proteine eine „Trafficking“- und Signalplattform, die Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Entdifferenzierung reguliert. Die „Tor“-Eigenschaften von TJs leiten sich primär von den Claudinen ab. Es wird vermutet, dass Claudine mit sich und anderen Claudinen Heterodimere oder Oligomere innerhalb der TJs der gleichen Zelle und den TJs der benachbarten Zellen bilden [Turksen und Troy, 2004]. Diese intermembranen Interaktionen (Seit-zu-Seit) können ein Claudin-Protein beinhalten (homomer oder homopolymer) oder verschiedene Claudine (heteromer oder heteropolymer). Die zwei extrazellulären luminalen Schleifen scheinen homo- und/oder heterotypische Interaktionen mit Claudinen auf Nachbarzellen zu vermitteln [Furuse et al., 1999; Tsukita et al., 2001]. Neben einer postulierten Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion bilden Claudine porenähnliche Strukturen und fungieren als parazelluläre Ionenkanäle, die entweder die parazelluläre Diffusion von bestimmten Ionen selektiv erleichtern oder beschränken [Anderson et al., 2004; Van Itallie et al., 2004]. Die charakteristische Ionenpermeabilität von bestimmten Epithelien wird vermutlich durch das Ausmaß des Repertoires an exprimierten Claudinen reflektiert [Furuse und Tsukita, 2006; Van Itallie und Anderson, 2006].

Die wichtige Rolle der Claudine in der Ionenhomöostase spiegelt sich in der Assoziation von bestimmten Claudinen mit humanen hereditären Erkrankungen wieder, z.B. der Nachweis von Claudin-14-Mutationen bei nicht syndromischer Taubheit [Wilcox et al., 2001], der Assoziation von Claudin-1-Mutationen mit neonataler

sklerosierender Cholangitis [Hadj-Rabia et al., 2004] und den in dieser Arbeit beschriebenen Claudin-16-Mutationen mit FHHNC.

4.2.5 Claudin-16 bildet einen nichtselektiven parazellulären Kationenkanal

Mit wenigen Ausnahmen [Müller et al., 2003; Kang et al., 2005; Müller et al., Hum Mol Genet. 2006; Müller et al., J Clin Endocrinol Metab. 2006; Sanjad et al., 2007; Konrad et al., 2008] betreffen alle Mutationen im CLDN16-Gen entweder eine der vier transmembranen Domänen oder eine der zwei extrazellulären Schleifen des Moleküls. Aufgrund der großen Anzahl von neutralen Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife wird vermutet, dass diese den interzellulären Raum überbrückt [Furuse et al., 1998]. Die extrazellulären Schleifen sind aber auch reich an geladenen Aminosäureresten. Mit zehn negativ geladenen Aminosäureresten beträgt die negative Gesamtladung der ersten extrazellulären Schleife -4 , was für Claudin-16 im Gegensatz zu anderen Claudinen einzigartig ist. Es wird vermutet, dass diese Eigenschaft verantwortlich für die Kationenselektivität des parazellulären Transportweges ist [Simon et al., 1999; Hou et al., 2005]. Die Mutationen der extrazellulären Schleifen könnten die Ladungselektivität in der die Pore formenden Region des Proteins verändern und dadurch die Diffusion von divalenten Kationen beeinflussen, wenn Mutationen z.B. geladene Aminosäurereste betreffen und so die Gesamtladung der Schleife verändern. Auch einige andere Claudine (z.B. Claudin-14 und -15) besitzen geladenen Aminosäurereste in ihren extrazellulären Schleifen, die von den Epithelzellen in den interzellulären Spalt hineinragen und ladungselektive Poren bilden könnten [Van Itallie und Anderson, 2006]. Angenommen wird, dass die Ionenselektivität jedes Claudins von der Menge und Art der geladenen Aminosäurereste der ersten extrazellulären Schleifen abhängt. Daher bestimmt das Expressionsmuster an Claudinen in einem gegebenen Epithel seine einzigartige parazelluläre Ionenselektivität. Positiv geladene Aminosäuren scheinen eher eine Barriere für Kationen zu sein, während negativ geladenen eher die Funktion einer Kationenpore übernehmen [Colegio et al., 2003; Colegio et al., 2002]. Wenn Ionen nun die parazelluläre Pore passieren, gehen sie vermutlich elektrostatische Interaktionen mit den geladenen Seiten innerhalb der Pore ein, in einer Weise abhängig vom Durchmesser und folglich der Ladungsdichte und der Hydrationsenergie des passierenden Ions [Angelow et al., 2007].

Interessanterweise betreffen die in unserem Kollektiv gefundenen Mutationen in der Mehrzahl einen Austausch eines Nukleotids, der zum Aminosäureaustausch im Bereich

der ersten extrazellulären Schleife des Claudin-16-Proteins führt. Diese Auffälligkeit war bereits in der ersten Studie der Familien F1 bis F8 [Weber et al., 2000] nachzuweisen und ist durch die ergänzenden genetischen Daten der Familien F9 bis F25 bestätigt. Insgesamt zeigen 67% der mutierten Allele eine Punktmutation in der Gensequenz, die für die erste extrazelluläre Schleife kodiert. Die Mutationen His141Asp und Arg149Leu resultieren in einem Verlust einer positiven Ladung und verändern folglich die Gesamtladung der Schleife. Aber nicht alle diese Mutationen betreffen geladene Aminosäurereste und führen daher auch nicht zu einer Veränderung der Gesamtladung der Schleife. Die Mutationen Leu145Pro, Leu151Thr und Leu151Phe ändern nicht die Ladung, aber betreffen alle Aminosäurereste, die hoch konserviert innerhalb der Claudin-Familie sind. Wichtige Merkmale der Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins scheinen durch diese Mutationen verändert zu werden und möglicherweise folgt daraus eine Konformationsänderung des Claudin-16 Proteins. Daraus scheint eine veränderte Proteinfunktion und veränderte parazelluläre Leitung zu resultieren. Denkbar ist auch, dass bestimmte Aminosäurereste für die Oligo- und Polymerisation strukturell notwendig sind. Ein Aminosäureaustausch könnte die Interaktionen mit anderen Claudinen innerhalb der Zellmembran oder die interzellulären Interaktionen mit Claudin-16 und/oder anderen Claudinen der benachbarten Zelle stören.

Die Expression von Claudin-16 ist auf den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife in der Niere beschränkt, wo der Hauptteil des Magnesiums rückresorbiert wird. Es wurde spekuliert, dass Claudin-16 allein oder in Kombination mit anderen Claudinen den Kern einer interzellulären Pore bildet, die für die parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Kalzium verantwortlich ist [Simon et al., 1999; Wong und Goodenough, 1999]. Angetrieben wird die parazelluläre Magnesiumreabsorption durch einen luminal positiven elektrochemischen Gradienten. Funktionelle Expressionsstudien in Zelllinien (LLC-PK1) konnten bei Expression von Claudin-16 eine erhöhte Natriumpermeabilität der TJs zeigen, sodass Claudin-16 den elektrochemischen Gradienten aufrecht zu erhalten scheint, der die Magnesiumreabsorption im TAL fördert [Hou et al., 2005]. Claudin-16 moduliert die Ionenselektivität von TJs bei *in vitro* Analysen in Zellkulturmodellen, indem es signifikant die Natrium-Permeabilität (P_{Na}) erhöht ohne Effekte auf die Chlorid-Permeabilität (P_{Cl}), sodass sich der Quotient P_{Na}/P_{Cl} erhöht [Hou et al., 2005; Konrad et al., 2008]. Die Erhöhung der Magnesium-

Permeabilität ist weit weniger betont verglichen mit der von monovalenten Alkali-Kationen, sodass Claudin-16 keine Magnesium und Kalzium selektiven parazellulären Kanäle zu formen scheint, sondern nichtselektive parazelluläre Kationenkanäle [Hou et al., 2005; Hou et al., 2007].

Hou et al. analysierten auch die Konsequenzen der meisten bis dahin veröffentlichten humanen CLDN16-Mutationen durch heterologe Expression *in vitro* [Hou et al., 2005]. Für Claudin-16-Mutanten konnte eine signifikant niedrigere Natrium-Permeabilität verglichen mit dem Claudin-16-Wildtyp und damit ein signifikanter Funktionsverlust gezeigt werden. Wie bereits vermutet, sind die negativ geladenen Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife besonders wichtig für die Funktion von Claudin-16. Konstrukte mit mehr als einer mutierten negativ geladenen Aminosäure und Verlust der negativen Ladungen zeigten die niedrigste Natrium-Permeabilität [Hou et al., 2005]. Folglich addieren sich die Ladungseffekte und sind nicht unabhängig voneinander. Ein Entfernen positiv geladener Aminosäuren hatte keinen Effekt auf die Funktion von Claudin-16 [Hou et al., 2005].

Die Dysfunktion von Claudin-16 im TAL des Nephrons führt zu einem Verlust der Kationenselektivität und so zur Zerstreuung des lumenpositiven Potentials, welches die Magnesiumreabsorption antreibt. Die *in vitro* gewonnen Erkenntnisse konnten durch ein Claudin-16-defizientes Mausmodell (Claudin-16 Knockdown-Mäuse) mit transgener RNAi Depletion von Claudin-16 bestätigt werden [Hou et al., 2007]. Die pathophysiologischen Veränderungen bei diesen Mäusen wie Hypomagnesiämie, Normokalziämie bei erhöhter Urinausscheidung von Magnesium und Kalzium und Nephrokalzinose sind denen von FHHNC-Patienten sehr ähnlich, sodass dieses Tiermodell für die menschliche FHHNC-Erkrankung ein adäquates *in vivo* Modell darstellt. Die Knockdown-Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen signifikanten Verlust der Kationenselektivität, reflektiert durch eine signifikante Verminderung des Diffusionspotentials in elektrophysiologischen Messungen von perfundierten Nierentubuli [Hou et al., 2007].

Die funktionelle Rolle von Claudin-16 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Der Effekt auf den transepithelialen Widerstand (TER) und die Natrium-Permeabilität zeigte unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Studien [Hou et al., 2005; Ikari et al., 2006; Kausalya et al., 2006; Konrad et al., 2008]. Allerdings bezogen auf die Elektrophysiologie sind diese Studien nicht gut vergleichbar, da verschiedene Zelllinien

benutzt wurden (MDCK, LLC-PK1). Aber alle Autoren konnten zeigen, dass der Wildtyp von Claudin-16 die Magnesium-Permeabilität bis zu einem gewissen Maße erhöht. Kausalya et al. zeigten eine erhöhte Magnesium-Permeabilität bei MDCK-C7 Zellen, die Claudin-16 exprimieren, aber der Quotient P_{Na}/P_{Cl} war nicht signifikant verändert [Kausalya et al., 2006]. Für Claudin-16-Mutanten konnte die Arbeitsgruppe keine Erhöhung der Magnesium-Permeabilität im Vergleich zum Wildtyp von Claudin-16 zeigen, und folgerte daraus, dass Punktmutationen im CLDN16-Gen *in vitro* zu einer Inaktivierung des parazellulären Magnesiumtransportes führen. Ikari et al. zeigten, dass die Expression von Claudin-16 in MDCK Zellen die Natrium-Permeabilität und den Quotienten P_{Na}/P_{Cl} verminderte, aber den transepithelialen Magnesiumtransport von apikal nach basal erhöhte [Ikari et al., 2006]. Es scheint, dass die von Hou et al. beschriebenen Änderungen des Permeabilitätsquotienten P_{Na}/P_{Cl} und dem Diffusionspotential nach Einführung von Claudin-16-Mutanten nur in LLC-PK1 Zellen bestimmt werden können und nicht in MDCK-7 Zellen, die von Kausalya et al. benutzt wurden. Unterschiedliche transepitheliale Widerstände der verschiedenen Zellen sind verantwortlich für diese unterschiedlichen Ergebnisse. In LLC-PK1 Zellen übertrifft die parazelluläre Leitung die transzelluläre Leitung als Resultat des niedrigen transepithelialen Widerstandes. Zusätzlich bestehen Unterschiede zwischen LLC-PK1- und MDCK-Zellen bezogen auf polarisiertes „Trafficking“ und die Lokalisation von endogenen Membranproteinen [Fölsch et al., 1999]. MDCK II Zellen sind bereits gut polarisierte Zellen und besitzen von vornherein eine hohe endogene Kationenselektivität, während LLC-PK1 eine Anionenselektivität besitzen [Hou et al., 2005]. MDCK II Zellen zeigten im Zellexperiment nach Einführung von Claudin-16 keine signifikante Änderung der parazellulären Permeabilität von Natrium, Chlorid und Magnesium [Hou et al., 2005]. LLC-PK1 Zellen scheinen ein passenderes Modell zu sein, da Funktionsanalysen von Claudin-16-Mutanten in LLC-PK1 Zellen schon gut zum FHHNC-Phänotyp korreliert werden konnten [Konrad et al., 2008].

Wenn man Claudine in Zelllinien einbringt, werden sie in vorbestehende Tight Junctions integriert. Die Expression von verschiedenen Claudinen kann den transepithelialen elektrischen Widerstand und die Ladungsselektivität ändern. Die Einführung exogener Claudine ändert die ladungsselektiven Poren in verschiedenen Epithelien als Resultat von Interaktionen zwischen endogenen und exogenen Claudinen in diesen Zelllinien. Ergebnisse anderer Studien zeigten, dass verschiedene Claudin-Subtypen den transepithelialen Widerstand in MDCK- und LLC-PK1-Zellen auf

unterschiedliche Weise verändern [Van Itallie et al., 2003; Furuse et al., 2001; Amasheh et al., 2002]. Claudin-16-Mutanten führten zu keinem kompletten Funktionsverlust und ändern die Ionenpermeabilität in unterschiedlichem Maße, sodass andere funktionelle Komponenten involviert sein müssen, möglicherweise Interaktionen mit endogenen Molekülen [Hou et al., 2005]. Diese heterophilen Interaktionen zwischen Claudin-16 und anderen Claudinen könnten die endogenen ionenleitenden Eigenschaften modulieren.

4.2.6 Claudin-16-Mutationen mit kompletten und partiellem Funktionsverlust – Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Hou et al. konnten zusätzlich *in vitro* erstmals funktionelle Unterschiede zwischen verschiedenen humanen CLDN16-Punktmutationen zeigen [Hou et al., 2005]. Einige Mutanten wiesen einen kompletten Funktionsverlust auf. Diese führten entweder zu einem instabilen Protein oder wurden nicht korrekt zur Plasmamembran transportiert. Mutanten, die nicht die Proteinexpression oder das „Trafficking“ beeinflussten und korrekt in Tight Junctions eingebaut wurden, zeigten zu einem variablen Grad eine veränderte Ionenpermeabilität und damit einen partiellen, aber signifikanten Funktionsverlust verglichen mit dem Wildtyp von Claudin-16. Zu den Mutanten, die eine beträchtliche Restfunktion besaßen, gehört die z.B. Leu151Phe-Mutation, die in unserer Kohorte bei 48% auftritt.

Bei FHHNC-Patienten variiert der Grad der Niereninsuffizienz stark, obwohl alle Patienten von einer schweren medullären Nephrokalzinose betroffen sind. Der Grund dieser Variabilität scheint unbekannt. Im Patientenkollektiv dieser Arbeit konnte keine offensichtliche Genotyp/Phänotyp-Korrelation etabliert werden (Kapitel 3.1.6).

Eine Nachfolge-Studie, die die hier charakterisierten 33 Patienten und zusätzliche 39 Patienten einschließt, konnte nach heterologer Expression in LLC-PK1 Zellen für manche Mutationen einen partiellen Funktionsverlust von Claudin-16 und für andere einen kompletten Verlust nachweisen [Konrad et al., 2008]. Patienten, deren Mutationen zu einem kompletten Funktionsverlust von Claudin-16 auf beiden Allelen führten, waren signifikant jünger bei Symptombeginn als Patienten, die zumindest ein mutiertes Allel besaßen, das nur zu einem partiellen Verlust der Claudin-16-Funktion führte. Zusätzlich zeigten Patienten mit komplettem Funktionsverlust beider Allele einen deutlich schnelleren Abfall der GFR, was zu einem früheren Beginn der Nierenersatztherapie führte, als Patienten, die zumindest ein mutiertes Allel mit einer

partiellen Claudin-16-Funktion aufwiesen. Es gab keine phänotypischen Unterschiede zwischen Patienten mit zwei Mutationen, die eine partielle Claudin-16-Funktion zeigten, und Patienten mit nur einer Mutation, die eine partielle Funktion besaß und einer Mutation auf dem zweiten Allel, die einen kompletten Funktionsverlust aufwies [Konrad et al., 2008]. Diese Ergebnisse entsprechen der rezessiven Natur der FHHNC-Erkrankung. Eine Mutation mit Restfunktion ist ausreichend, um einen milderen klinischen Verlauf zu bestimmen. **Abbildung 4.1** zeigt das Claudin-16 Proteinmodell mit den in unserem Kollektiv gefundenen Mutationen und ordnet diese einem partiellen oder kompletten Funktionsverlust zu.

Die Funktionsanalyse von Konrad et al. zeigte eine Genotyp/Phänotyp Korrelation mit speziellem Fokus auf die Progression des Nierenversagens in einer großen Kohorte von FHHNC-Patienten [Konrad et al., 2008]. Homozygote oder compound heterozygote Patienten, die zumindest eine Claudin-16-Mutation mit Restfunktion besaßen, zeigten einen besseren Verlauf der Erkrankung als Patienten, die einen kompletten Funktionsverlust ihrer Mutationen hatten. Eine partielle Funktion von Claudin-16 scheint eine Verschlechterung der Nierenfunktion bei FHHNC zu verzögern, daher erlaubt die Bestimmung des Genotyps bei FHHNC-Patienten den klinischen Verlauf bis zu einem gewissen Masse vorherzusagen.

Die Analyse der 33 Patienten in dieser Arbeit konnte im Gegensatz zu Konrad et al. keine Genotyp/Phänotyp-Korrelation mit Bezug auf den Erkrankungsverlauf und im Besonderen auf das Fortschreiten der Nierenfunktion aufzeigen. Der Hauptgrund hierfür sind die Expressionsdaten, d.h. die funktionellen Untersuchungen, nach denen Konrad et al. die Mutationen gruppieren konnten. Aber die in der Kohorte von 33 Patienten gemachte Beobachtung, dass eine starke intrafamiliäre Konkordanz bezogen auf den klinischen Erkrankungsverlauf in der Mehrheit der multiplex Familien existiert, wird durch die Daten von Konrad et al. unterstützt. Die verschiedenen CLDN16-Genotypen spielen eine wichtige Rolle für das Fortschreiten der Niereninsuffizienz.

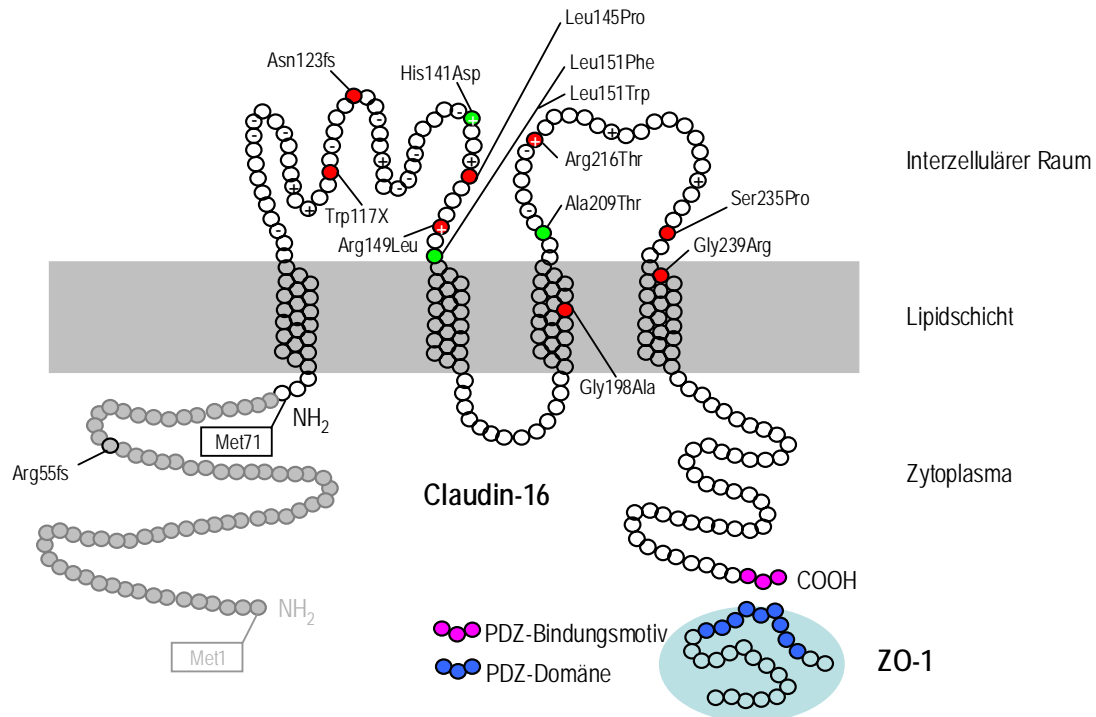


Abbildung 4.1 Proteinmodell von Claudin-16 (Aminosäurereste abgebildet als Kreise, die Lipidschicht der Zellmembran ist grau dargestellt, intrazellulärer NH₂- und COOH-Terminus). Mutanten, die zu einem kompletten Funktionsverlust von Claudin-16 führen, sind rot dargestellt und Mutanten, die eine signifikante Restfunktion aufweisen, sind grün dargestellt [Konrad et al., 2008]. Das PDZ-Bindungsmotiv (rosa) und die PDZ-Domäne von ZO-1 (blau) sind dargestellt. Die Ladungen der Aminosäuren (Wildtyp) in den extrazellulären Schleifen sind markiert.

4.2.7 CLDN16-Mutationen mit Defekten im intrazellulären „Trafficking“

Eine zweite Studie bezieht sich auf die Konsequenzen von humanen CLDN16-Mutationen [Kausalya et al., 2006]. Kausalya et al. konnten durch eine systematische Analyse von CLDN16-Mutationen zeigen, dass einige Mutanten intrazellulär verbleiben und Defekte im intrazellulären „Trafficking“ aufweisen. Die meisten untersuchten CLDN16-Mutanten akkumulierten in unterschiedlichen Zellorganellen und wurden gar nicht in die Tight Junctions eingebaut [Kausayla et al., 2006]. Daher ist eine Einteilung der verschiedenen CLDN16-Mutationen, die mit der FHHNC-Erkrankung assoziiert sind, in zwei Kategorien möglich. Eine FHHNC-Erkrankung kann entstehen, erstens durch Mutationen, die das intrazelluläre „Trafficking“ betreffen und zu einer intrazellulären Retention von Claudin-16 führen oder zweitens durch Mutationen, die zwar korrekt in die Tight Junctions eingebaut werden, aber in ihrer Funktion defekt sind [Kausayla et al., 2006]. Mutanten der ersten Kategorie akkumulieren in verschiedenen Zellorganellen des exozytischen oder endozytischen Transportweges und sind daher gar nicht oder nur vorübergehend an der Zelloberfläche zu finden. Sie betreffen also die

normale Zelloberflächenexpression und spiegeln so Defekte im Zelltrafficking an verschiedenen Schritten des Biosynthese- oder Endozytoseweges wieder. Diese Mutanten finden sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder Golgi Apparat und/oder Lysosomen. Einige CLDN16-Mutanten können das ER nicht verlassen. Vermutlich handelt es sich um Defekte der Proteinfaltung, Membrantopologie und/oder Oligomerisation. Ähnlich verhält sich auch die cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Mutante CFTR Δ F508, die häufigste Mutation bei Patienten mit Zystischer Fibrose, die auch im ER akkumuliert [Denning et al., 1992].

Während der Biosynthese und Einführung in das ER werden integrale Membranproteine mit Chaperonen assoziiert, die für das korrekte Falten von Proteinen verantwortlich sind und dafür sorgen, dass Membranproteine solange im ER verbleiben bis sie ihre korrekte Konformation aufweisen [Sitia und Braakmann, 2003]. Wenn ein neu synthetisiertes Protein nicht korrekt gefaltet wird, wird es aus dem ER entfernt und an Ubiquitin gebunden und von Proteasomen zerstört [Jarosch et al., 2002]. Diese Qualitätskontrolle ist dafür verantwortlich, dass nur korrekt gefaltete und funktionierende Proteine das ER verlassen und ihre endgültige Bestimmung erreichen.

Zellpermeable chemische Verbindungen (pharmakologische Chaperone), die das Falten von Membranproteinen erleichtern, können für im ER akkumulierte fehlgefaltete Proteine wieder zu einer Expressierung in der Zellmembran führen [Ulloa-Aguirre et al., 2004]. Auf welche Weise Chaperone funktionieren ist nicht ganz klar. Möglicherweise stabilisieren sie fehlgefaltete Proteine oder verhindern die Aggregation und nicht produktive Interaktion mit Proteinen des ER oder beeinflussen die Aktivität, das ER zu verlassen. Solche pharmakologischen Chaperone sind z.B. Thapsigargin oder 4-Phenylbutyrat (4-PBA). Für einige CLDN16-Mutanten, die intrazellulär akkumulierten, konnten Kausayla et al. je nach Mutante und Chaperon-Verbindung eine 2-6 mal höhere Zellexpression zeigen [Kausayla et al., 2006]. Dies könnte neue Therapiestrategien für FHHNC-Patienten mit bestimmten CLDN16-Mutationen eröffnen. 4-PBA ist wenig zytotoxisch und befindet sich in klinischen Studien bei Patienten mit Zystischer Fibrose, die eine CFTR Δ F508 Mutation haben [Zeitlin et al., 2002]. Allerdings konnten Kausayla et al. für Mutanten, deren Expression an der Zelloberfläche durch Chaperone (4-PBA) gelang, keine Erhöhung der Magnesiumpermeabilität nachweisen [Kausayla et al., 2006]. Der fehlende Einbau in Tight Junctions in der Zellmembran ist somit nicht allein krankheitsverursachend, die Mutanten scheinen zusätzlich in ihrer Funktion gestört.

Kausayla et al. konnten keine Korrelation zwischen einer bestimmten Mutation und ihrer subzellulären Lokalisation mit dem klinischen Phänotyp nachweisen. Eine Einteilung in zwei Mutationskategorien, normale Expression in der Zellmembran versus „Trafficking“-Defekte, zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Alters bei Symptombeginn oder der Verschlechterung der Nierenfunktion. Daher ist die Einteilung der Mutationen nur allein aufgrund des Zelltraffickings ohne den elektrophysiologischen Beweis von Claudin-16-Restfunktion nicht nützlich für eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation. Dies wird weiter unterstützt durch die Beobachtung von Mutationen, die korrekt in Tight Junctions lokalisieren, aber trotzdem einen kompletten Funktionsverlust aufweisen [Konrad et al., 2008].

4.2.8 Mutationen im Gen für Claudin-16 oder Claudin-19 verursachen FHHNC – beide Claudine generieren die Kationenselektivität der Tight Junctions in synergistischer Weise

FHHNC ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Ein neuer Genlocus für rezessiven renalen Magnesiumverlust konnte auf Chromosom 1p34.2 lokalisiert und CLDN19-Mutationen bei einer Kohorte von Patienten, die hauptsächlich aus Spanien stammen, identifiziert werden [Konrad et al., 2006]. Claudin-19, ein weiteres Mitglied der Claudin-Familie, wird in wenigen Organen exprimiert. Eine starke Expression findet sich in der Retina und den renalen Tubuli, wo sich eine große Ähnlichkeit im Expressionsmusters zu Claudin-16 mit einer Koloalisation im TAL und geringer im DCT zeigt. Beide Claudine werden in Zell-Zell-Kontakten exprimiert, und es erscheint daher wahrscheinlich, dass beide im Bereich der Tight Junction-Barriere von renalen Tubuli interagieren und in die parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Kalzium involviert sind.

Der renale Phänotyp von Patienten mit CLDN19-Mutationen ist nicht unterscheidbar von dem der Patienten mit CLDN16-Mutationen. Patienten mit CLDN19-Mutationen haben aber im Vergleich deutlich schwerere okuläre Anomalien, erklärbar, da Claudin-19 eine wichtige Komponente der Tight Junction in retinalem Pigmentepithel ist [Konrad et al., 2006]. Patienten mit Mutationen im CLDN19-Gen zeigen eine deutliche Missbildung der optischen Linse, welche mit drohender Blindheit und der Manifestation eines horizontalen Nystagmus assoziiert ist. In früheren Beschreibungen fällt bereits auf, dass spanische Patienten eine höhere Frequenz von Augenbeteiligung haben [Benigno et al., 2000; Loris Pablo et al., 2004]. Für Patienten aus Spanien mit schweren

okulären Anomalien konnte ein Founder-Effekt im CLDN19-Gen nachgewiesen werden [Konrad et al., 2006]. Für diesen phänotypischen Unterschied ist eine genetische Heterogenität verantwortlich und CLDN19-Mutationen sind der ursächliche Defekt für diese Untergruppe von FHHNC-Patienten.

Die FHHNC-Erkrankung wird durch Mutationen in beiden Genen, Claudin-16 und Claudin-19, verursacht. In Nierenepithelzellen von Schweinen funktioniert Claudin-19 als Chlorid-Blocker und Claudin-16 als Natrium-Kanal und die Koexpression von Claudin-19 und -16 generiert die Kationenselektivität der Tight Junctions in synergistischer Weise [Hou et al., 2008]. Die Unterbrechung dieser Interaktion durch Einführung von FHHNC verursachenden Mutationen entweder im CLDN19- oder CLDN16-Gen verhindern diesen synergistischen Effekt. Claudin-16 scheint mit Claudin-19 zu interagieren und diese Interaktion ist verantwortlich für die Kationenselektivität von Tight Junctions.

Die individuelle Funktion von Claudin-16 und -19 besteht darin, die Kationenselektivität des parazellulären Weges zu erhöhen. Claudin-19- und Claudin-16-Mutanten, die keine „Trafficking“-Defekte zeigen und korrekt in Tight Junctions eingebaut werden, zeigten beide einen partiellen Funktionsverlust. Exprimiert man Claudin-16 alleine in LLC-PK1 Zellen, so wurde ein großer Natriumfluss ohne Effekte auf die Chlorid-Permeabilität generiert [Hou et al., 2005]. Claudin-19 reduzierte in LLC-PK1 Zellen die parazelluläre Chlorid-Permeabilität und erhöhte den transepithelialen Widerstand ohne signifikante Effekte auf die Natrium-Permeabilität [Hou et al., 2008]. Die Expression beider Claudine resultierte in einer dramatischen Erhöhung der Natrium-Permeabilität und einer dramatischen Verminderung der Chlorid-Permeabilität, was zu einer Transformation der Tight Junctions von LLC-PK1 Zellen von anionenselektiv zu kationenselektiv führte [Hou et al., 2008]. So entsteht ein hoch kationenselektiver parazellulärer Weg, reflektiert durch das große positive Diffusionspotential über die Zellmonolayer.

Es ist schwierig, einzelne Claudin-Claudin Interaktionen ohne Interferenz von anderen Proteinen zu testen, da die biochemische Natur von Tight Junctions sehr komplex ist und starke Protein-Protein Interaktion innerhalb von Tight Junctions existieren. Einfache Zellsysteme wie z.B. Hefezellen und Fibroblasten formen keine Tight Junctions und exprimieren keine endogenen Tight Junction Proteine wie Occludin oder Claudine. Diese Modelle sind geeignet, um Interaktionen von Claudin-16 und -19 zu analysieren ohne Störung durch andere Proteininteraktionen. Für Claudin-16 und -19

konnte eine Co-Polymerisation (heteromere Interaktion) innerhalb der Zellmembran in Hefe- und Epithelzellmodellen nachgewiesen werden [Hou et al., 2008]. Claudin-19 interagiert mit sich selbst und mit Claudin-16, indem es laterale Interaktionen innerhalb der Zellmembran bildet, wobei die gleiche Menge an homomeren und heteromeren Interaktionen auftrat. Claudin-16 interagiert nicht mit sich selbst. In Fibroblasten zeigte sich, dass Claudin-19 Claudin-16 in Tight Junctions rekrutierte und co-polymerisierte, als Hinweis auf die heteromeren Interaktionen zwischen Claudin-16 und -19 [Hou et al., 2008]. Das Fehlen von Claudin-16 homomeren Interaktionen und seine Abhängigkeit von Claudin-19, in Tight Junctions rekrutiert und co-polymerisiert zu werden, betont die Bedeutung von Claudin-16/-19 heteromeren Interaktionen im „Trafficking“ und Polymerisation von Claudin-16, obwohl die Funktion von Claudin-16 nicht abhängig sein muss von Claudin-19. Mutanten in beiden Claudinen, die mit der Fähigkeit zu interagieren interferieren, unterbinden die synergistische physiologische Funktion. Mutanten von Claudin-19 zeigten in unterschiedlichem Maße eine Erniedrigung der homomeren und/oder heteromeren Interaktionen mit Claudin-16. Mutanten von Claudin-16 störten die heteromeren Interaktionen mit Claudin-19 nur gering, nicht signifikant. Exprimiert man Mutanten von Claudin-19 mit dem Wildtyp von Claudin-16, so zeigte sich in LLC-PK1 Zellen ein Dilutionspotential wie beim Claudin-16-Wildtyp alleine, umgekehrt bei der Expression von Claudin-19-Wildtyp und Claudin-16-Mutanten [Hou et al., 2008].

Die Magnesiumreabsorption erfolgt über den parazellulären Weg im TAL und hängt stark vom transepithelialen Potential als Antrieb ab [Greger, 1985]. Einige *in vitro* Studien haben die Beziehung von Magnesiumfluss im TAL und der transepithelialen Ladung untersucht [Di Stefano et al., 1993; Hebert und Andreoli, 1986; Mandon et al., 1993; Shageri und Agus, 1982]. Bei einer lumenpositiven transepithelialen Ladung wird Magnesium reabsorbiert und bei negativer sezerniert. Die Abhängigkeit des Magnesiumtransportes vom transepithelialen Potential deutet auf einen passiven Prozess via parazellulärem Weg hin. Wenn TAL-Zellen mit isotonischer NaCl-Lösung durchspült werden, ist das Lumen positiv (3-10 mV) aufgrund der apikalen Kaliumsekretion durch ROMK-Kanäle [Greger und Schlatter, 1983]. Im Prozess der Harndilution und -konzentrierung wird die Resorption von NaCl von der Wasserreabsorption getrennt, da der TAL impermeabel für Wasser ist. Die aktive NaCl-Reabsorption via NKCC2-Transporter in der apikalen Membran der TAL-Zelle

resultiert in einer luminalen Flüssigkeitsdilution und einer erhöhten NaCl-Konzentration im peritubulären Raum. Ein transzellulärer NaCl-Konzentrationsgradient von peritubulär zum Lumen wird zunehmend verstärkt. Da der parazelluläre Weg im TAL kationenselektiv ist, diffundiert Natrium entlang des Konzentrationsgefälles über den parazellulären Weg von peritubulär zurück ins Lumen. Als Resultat dieses Natriumflusses erhöht sich das transepitheliale Potential lumenpositiv bis auf 30 mV [Rocha und Kokko, 1973; Greger, 1981]. Dieser hohe luminal positive elektrochemische Gradient treibt die Magnesiumreabsorption an. Claudin-16 und -19 sind für die Kationenselektivität der Tight Junctions wichtig. Claudin-16 funktioniert als Na-Kanal [Hou et al., 2005] und Claudin-19 als Cl-Blocker [Hou et al., 2008]. Wenn Tight Junctions von *in vitro* kultivierten Zellmodellen (kein endogenes Claudin-16 und -19) mit Claudin-16 und -19 ausgestattet werden, zeigen diese eine hohe Kationenselektivität aufgrund der synergistischen Effekte des Claudin-16 und -19 Proteinkomplexes. Der entstehende Quotient P_{Na}/P_{Cl} in diesem Zellmodell ist dem in nativen Maus TAL-Zellen sehr ähnlich [Hou et al., 2007]. Vermutlich spielen Claudin-16 und -19 bei der Modulation der Ionenselektivität im TAL eine ähnliche Rolle wie in LLC-PK1 Zellen und kontrollieren so den transepithelialen Spannungsgradienten im TAL. Bei einem Funktionsverlust von Claudin-16 und Claudin-19 im TAL werden die renalen Tight Junctions sehr permeabel für Chlorid, aber nicht für Natrium, und zeigen eine hohe Anionenselektivität. Es käme zur Zerstreuung des lumenpositiven Potentials und zu einer Umkehrung in ein luminal negatives Potential, was zu einem renalem Magnesium- und auch Kalziumverlust führt, da Kalzium im TAL dem gleichen Weg wie Magnesium folgt. **Abbildung 4.2** zeigt schematisch die Funktion von renalen Tight Junctions und den Mechanismus der Magnesiumreabsorption.

Andere Claudine wie -3, -10 und -11, die auch im TAL exprimiert werden, könnten auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Ionenselektivität von Tight Junctions im TAL spielen [Kiuchi-Saishin, 2002]. Im Besonderen erniedrigt Claudin-10 die Kationenselektivität von Tight Junctions in MDCK- und LLC-PK1-Zellen [Van Itallie et al., 2006], sodass Claudin-10 ein möglicher Gegenspieler für den Claudin-16/-19 Proteinkomplex sein könnte.

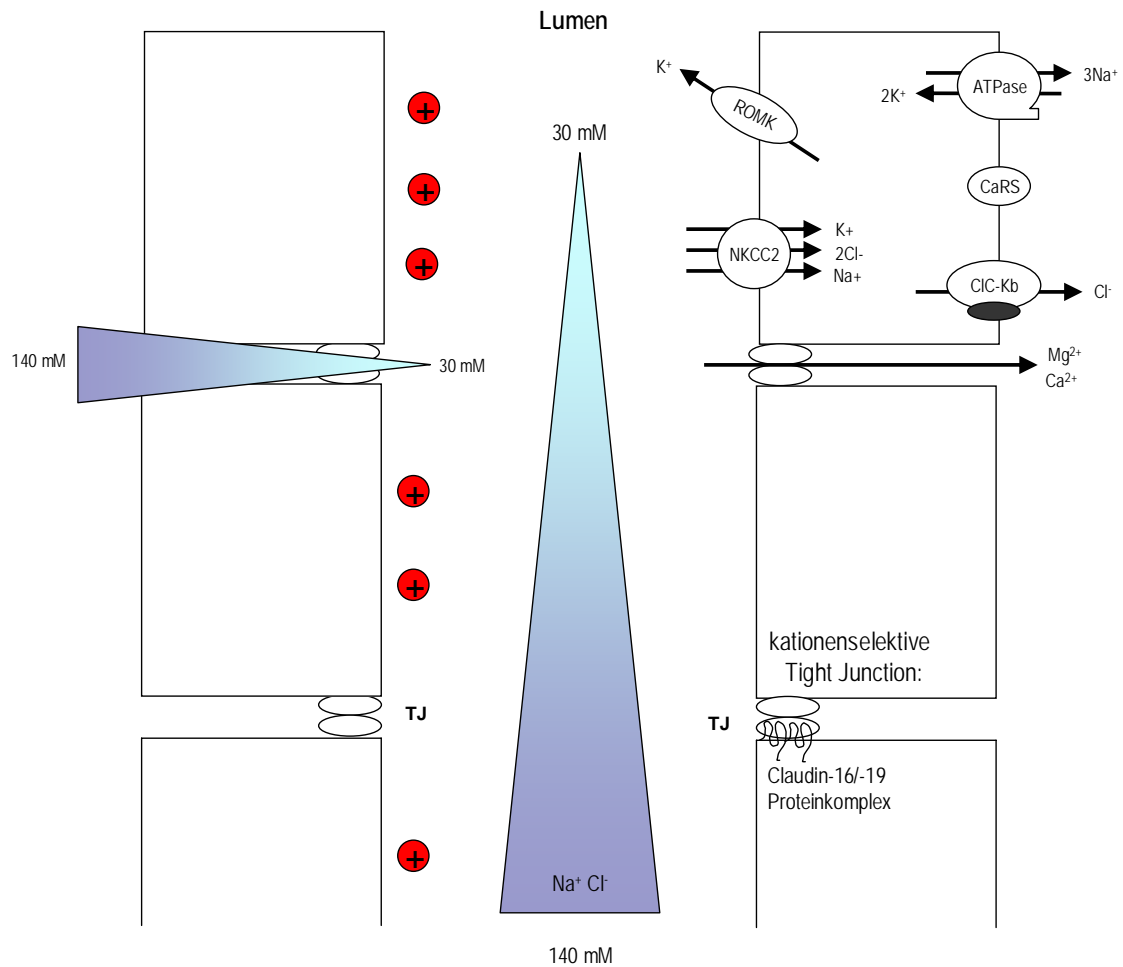


Abbildung 4.2 Mechanismus der Magnesiumreabsorption. Im TAL wird NaCl via Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) in der apikalen Membran resorbiert. Basolateral sorgt die Na⁺/K⁺-ATPase für Energie und den Austausch von Natrium gegen Kalium, wobei Natrium die Zelle peritubulär verlässt und Kalium in die Zelle einströmt. Kalium wird apikal durch den Kalium-Kanal (ROMK) ins Lumen sezerniert. Chlorid verlässt die Zelle an der basalen Membran durch den Chlorid-Kanal (CIC-Kb). Die kontinuierliche NaCl-Reabsorption entlang des TAL führt zu einer tubulären Flüssigkeitsdilution und der Entstehung eines transepithelialen NaCl-Konzentrationsgradienten von peritubulär zum Lumen hin. Da die Epithelzellen im TAL kationenselektive Tight Junctions besitzen, führt der NaCl-Konzentrationsgradient zu einem lumenpositiven transepithelialen Diffusionspotential. Dieses positive Potential ist die Antriebskraft für Magnesium- und Kalziumreabsorption via Tight Junction, dem parazellulären Weg. Claudin-16 und -19 interagieren innerhalb der Tight junctions und sind für die Kationenselektivität der Tight Junctions verantwortlich [Hou et al., 2008].

4.3 Familienuntersuchung

In der Familienuntersuchung ergibt sich anamnestisch, durch sonographische Untersuchung der Nieren und durch Bestimmung der Kalziumausscheidung im Urin eine auffällige Häufung von Hyperkalziurie, Nephrolithiasis, Nephrokalzinose und Harnwegsinfekten bei ansonsten nicht an FHHNC erkrankten Familienangehörigen. Wir finden Hyperkalziurie, Nephrolithiasis, Nephrokalzinose und/oder Harnwegsinfekte bei 56% der untersuchten Familien (13 von 23 Familien). Eine ähnliche Beobachtung konnten bereits von Praga et al. in einer Studie von fünf Familien gemacht werden [Praga et al., 1995]. In neun Familien unseres Kollektivs leiden entweder Vater oder Mutter, die beide obligate Träger einer heterozygoten CLDN16-Mutation sind, an Nephrolithiasis, Nephrokalzinose und/oder Hyperkalziurie. Folglich scheint eine Beziehung zwischen isolierter Hyperkalziurie und Mutationen im CLDN16-Gen zu existieren. Mit Ausnahme des Onkels von Patient F5, der an einer Nephrolithiasis leidet, konnte für alle zugänglichen Familienangehörigen, die eine Symptomatik in oben genanntem Sinn aufweisen, eine heterozygote Mutation im CLDN16-Gen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse der Familienanalyse unterstützen die Hypothese eines ursächlichen Zusammenhanges von Hyperkalziurie und heterozygoten CLDN16-Mutationen.

Im Umkehrschluss lässt sich vermuten, dass Mutationsanalysen von Familien, die an familiärer Hyperkalziurie in Kombination mit Nephrolithiasis und/oder Nephrokalzinose (mit einem offensichtlich dominanten Vererbungsmodus) leiden, heterozygote Mutationen im CLDN16-Gen zumindest in einigen Familien finden lassen. Das macht CLDN16 zu einem Kandidaten-Gen für familiäre hyperkalziurische Nephrolithiasis.

Nephrolithiasis betrifft etwa 5% der Erwachsenen und ist oft mit Hyperkalziurie assoziiert [Stechman et al., 2007]. Idiopathische Hyperkalziurie tritt in etwa 5-10% der Gesamtpopulation auf und wird am häufigsten bei Patienten mit kalziumhaltigen Nierensteinen oder Osteoporose gefunden [Vezzoli et al., 2007]. Nephrolithiasis ist eine häufige Störung und assoziiert mit verschiedenen metabolischen Veränderungen, wie z.B. Hyperkalziurie, Hyperphosphaturie, Hyperoxalurie, Hypozitraturie, Hyperurikosurie, Zysteinurie, vermindertem Harnvolumen und Defekten der Urinansäuerung. Die Ätiologie dieser metabolischen Veränderungen und einer Nephrolithiasis ist multifaktoriell und bestimmt von Interaktionen zwischen Umwelteinflüssen und

genetischen Determinanten. Die Umwelteinflüsse betreffen diätetische Aufnahme von Salz, Protein, Kalzium und anderen Nahrungsbestandteilen, Flüssigkeitsaufnahme, Harnwegsinfekte, sozioökonomischer Status, Lifestyle und Klima. Hyperkalziurie ist wahrscheinlich ein polygenetisches Phänomen. Beobachtungen bei monogenen Erkrankungen, die durch kalziumhaltige Nierensteine, Hyperkalziurie und/oder Nephrokalzinose charakterisiert sind, sprechen für eine Anzahl von Genen als Kandidaten-Gene in der Pathogenese von idiopathischer Hyperkalziurie. Studien von monogenen Formen der hyperkalziurischen Nephrolithiasis z.B. Bartter-Syndrome, Dent's Disease, autosomal dominante hypokalziämische Hyperkalziurie (ADHH), hyperkalziurische Nephrolithiasis mit Hypophosphatämie und FHHNC haben eine Menge von Transportern, Kanälen und Rezeptoren identifiziert, die in der Regulation der renalen Resorption von Kalzium involviert sind.

5 Zusammenfassung

Die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) ist eine autosomal rezessive renal-tubuläre Erkrankung, die häufig mit progredientem Nierenversagen assoziiert ist. Der primäre Defekt besteht in einer gestörten tubulären Reabsorption von Magnesium und Kalzium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) der Niere. Mutationen im CLDN16-Gen (früher PCLN1-Gen), welches für das renale Tight Junction Protein Claudin-16 kodiert, konnten als zugrunde liegender genetischer Defekt identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit stellt umfassende klinische Daten und die Ergebnisse der CLDN16-Mutationsanalyse von 25 FHHNC-Familien mit 33 Betroffenen dar. Die Erkrankung manifestiert sich in der frühen Kindheit. Das mediane Alter bei Manifestation der Erkrankung liegt in unserem Kollektiv bei 3,5 Jahren. Hauptmanifestationssymptome sind Harnwegsinfekte, Polyurie und Hämaturie. Im Gegensatz zu anderen Tubulopathien ist die FHHNC durch eine gehäuft auftretende terminale Niereninsuffizienz in der frühen Adoleszenz charakterisiert. Bei Diagnosestellung ist bei 11 Patienten unseres Kollektivs die GFR bereits auf kleiner 60 ml/min/1,73 m² reduziert. 12 Patienten zeigen im Verlauf eine terminale Niereninsuffizienz, im Median mit 14,5 Jahren. Die Therapie mit Magnesiumsalzen oder Thiaziddiuretika hat keinen Effekt auf die Progression der Niereninsuffizienz.

Die Genotyp-Analyse ergibt außer bei drei Allelen CLDN16-Mutationen (94%) mit 15 verschiedenen Mutationen, wobei 8 neue Mutationen identifiziert werden konnten. Eine auffällige Häufung zeigt sich für die Mutation Leu151Phe mit 48% aller mutierten Allele und eine Haplotypen-Analyse weist auf einen Founder-Effekt für FHHNC-Patienten, die aus Deutschland und Osteuropa stammen, hin.

Zunächst wurde angenommen, dass das humane Claudin-16-Gen für ein 305 Aminosäure langes Protein kodiert. Es finden sich aber zwei mögliche Startcodons (Methionin 1 und Methionin 71). Interspezies-Vergleiche von Claudin-16 und ein mit 16,7% gehäuft auftretender frameshift-Polymorphismus an Aminosäureposition 55 unterstützen die Hypothese, dass die Translation an Methionin 71 beginnt und das Claudin-16-Protein um 70 Aminosäuren kürzer ist.

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation bezüglich Erkrankungsverlauf und Fortschreiten der Niereninsuffizienz findet sich im Kollektiv dieser Arbeit nicht. Aber es existiert eine starke intrafamiliäre Konkordanz bezogen auf den Erkrankungsverlauf in der Mehrheit

der Multiplex-Familien. Dies unterstützt die These, dass die verschiedenen CLDN16-Genotypen eine wichtige Rolle für das Fortschreiten der Niereninsuffizienz spielen. Erst kürzlich konnte für ein großes Kollektiv, das die 33 Patienten dieser Arbeit einschließt, gezeigt werden, dass manche CLDN16-Mutationen einen partiellen Funktionsverlust von Claudin-16 und andere einen kompletten Funktionsverlust bedingen. Patienten, deren Mutationen zu einem kompletten Funktionsverlust von Claudin-16 auf beiden Allelen führten, waren signifikant jünger bei Symptombeginn und zeigten eine deutlich schnellere Abnahme der Nierenfunktion.

In 13 von 23 Familien des Kollektivs wird eine Hyperkalziurie und/oder Nephrolithiasis bei ansonsten gesunden Familienangehörigen beobachtet. Folglich scheinen heterozygote CLDN16-Mutationen eine Rolle bei hyperkalziurischer Nephrolithiasis zu spielen. Diese Beobachtung macht CLDN16 zu einem Kandidaten-Gen für familiäre Hyperkalziurie und familiären Formen von Urolithiasis.

6 Literaturverzeichnis

- Adams ND, Rowe JC.* Nephrocalcinosis. *Clin Perinatol.* 1992 Mar; 19(1):179-95.
- Aguado MJ, Canals Baeza A, Sanguino López L, Gavilán Martín C, Flores Serrano J.* Hipomagnesemia familiar con hipercaciuria y nefrocacinosis. *An Esp Pediatr* 2001; 54: 174-177.
- Agus ZS.* Hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jul; 10(7):1616-22. Review.
- Al-Elq AH.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in 2 sisters. *Saudi Med J.* 2008 Mar; 29(3):447-51.
- Alexander RT, Hoenderop JG, Bindels RJ.* Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Aug; 19(8):1451-8. Review.
- Alon US.* Nephrocalcinosis. *Curr Opin Pediatr.* 1997 Apr; 9(2):160-5. Review.
- Altura BM, Altura BT, Carella A, Turlapaty PD.* Ca²⁺ coupling in vascular smooth muscle: Mg²⁺ and buffer effects on contractility and membrane Ca²⁺ movements. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982 Apr; 60(4):459-82. Review.
- Altura BM.* Basic biochemistry and physiology of magnesium: a brief review. *Magn Trace Elem.* 1991-1992; 10(2-4):167-71. Review.
- Altura BT, Altura BM.* A method for distinguishing ionized, complexed and protein-bound Mg in normal and diseased subjects. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1994; 217:83-7. Review.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M.* Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002 Dec 15; 115(Pt 24):4969-76.
- Anderson JM, Van Itallie CM.* Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* 1995 Oct; 269(4 Pt 1):G467-75. Review.
- Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS.* Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Apr; 16(2):140-5. Review.
- Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, Yu AS.* Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jul; 293(1):F166-77.

- Bapty BW, Dai LJ, Ritchie G, Canaff L, Hendy GN, Quamme GA.* Mg²⁺/Ca²⁺ sensing inhibits hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol.* 1998 Sep; 275(3 Pt 2):F353-60.
- Bartter FC, Pronove P, Gill JR Jr, Maccardle RC.* Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med.* 1962 Dec; 33:811-28.
- Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, von Vigier RO, Truttmann AC, Bianchetti MG.* Hypomagnesaemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 May; 15(5):605-10. Review.
- Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F.* Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet.* 2001 Nov; 29(3):310-4.
- Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P.* Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 2001 Jun; 59(6):2206-15.
- Brown EM, MacLeod RJ.* Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 2001 Jan; 81(1):239-297. Review.
- Cetrullo N, Guadagni MG, Piana G.* Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. *Eur J Paediatr Dent.* 2006 Sep; 7(3):146-50.
- Chadwick RB, Conrad MP, McGinnis MD, Johnston-Dow L, Spurgeon SL, Kronick MN.* Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. *Biotechniques.* 1996 Apr; 20(4):676-83.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM.* Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976 Sep; 127(3):1550-7.
- Coe FL, Parks JH, Bushinsky DA, Langman CB, Favus MJ.* Chlorthalidone promotes mineral retention in patients with idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int.* 1988 Jun; 33(6):1140-6.

- Cole DE, Janicic N, Salisbury SR, Hendy GN.* Neonatal severe hyperparathyroidism, secondary hyperparathyroidism, and familial hypocalciuric hypercalcemia: multiple different phenotypes associated with an inactivating Alu insertion mutation of the calcium-sensing receptor gene. *Am J Med Genet.* 1997 Aug 8; 71(2):202-10. Erratum in: *Am J Med Genet* 1997 Oct 17; 72(2):251-2.
- Cole DE, Quamme GA.* J Inherited disorders of renal magnesium handling. *Am Soc Nephrol.* 2000 Oct; 11(10):1937-47.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM.* Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jul; 283(1):C142-7.
- Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM.* Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Jun; 284(6):C1346-54.
- Dai LJ, Friedman PA, Quamme GA.* Cellular mechanisms of chlorothiazide and cellular potassium depletion on Mg^{2+} uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* 1997 Apr; 51(4):1008-17.
- Dai LJ, Ritchie G, Kerstan D, Kang HS, Cole DE, Quamme GA.* Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev.* 2001 Jan; 81(1):51-84. Review.
- De Bellis G, Manoni M, Pergolizzi R, Redolfi ME, Lazzana M.* A more stringent choice of primers can improve the performance of fluorescent automated DNA sequencers. *Biotechniques.* 1992 Dec; 13(6):892-4, 897.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ.* Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992 Aug 27; 358(6389):761-4.
- De Rouffignac C, Quamme G.* Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev.* 1994 Apr; 74(2):305-22.
- Di Stefano A, Roinel N, de Rouffignac C, Wittner M.* Transepithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process. *Ren Physiol Biochem.* 1993 Jul-Aug; 16(4):157-66.
- Elin RJ.* Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Am J Clin Pathol.* 1994 Nov; 102(5):616-22. Review.

- Elisaf M, Panteli K, Theodorou J, Siamopoulos KC.* Fractional excretion of magnesium in normal subjects and in patients with hypomagnesemia. *Magnes Res.* 1997 Dec; 10(4):315-20.
- Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ.* Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature.* 2001 Nov 29; 414(6863):558-61.
- Evans RA, Carter JN, George CR, Walls RS, Newland RC, McDonnell GD, Lawrence JR.* The congenital "magnesium-losing kidney". Report of two patients. *Q J Med.* 1981; 50(197):39-52.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM.* The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6; 273(45):29745-53.
- Fölsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I.* A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell.* 1999 Oct 15; 99(2):189-98.
- Freeman RM, Pearson E.* Hypomagnesemia of unknown etiology. *Am J Med.* 1966 Oct; 41(4):645-56.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec; 123(6 Pt 2):1777-88.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.* Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29; 141(7):1539-50.
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S.* Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 2001 Apr 16; 153(2):263-72.
- Furuse M, Tsukita S.* Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 2006 Apr; 16(4):181-8. Review.
- Geven WB, Monnens LA, Willems HL, Buijs WC, ter Haar BG.* Renal magnesium wasting in two families with autosomal dominant inheritance. *Kidney Int.* 1987 May; 31(5):1140-4.

- Geven WB, Monnens LA, Willems JL, Buijs W, Hamel CJ.* Isolated autosomal recessive renal magnesium loss in two sisters. *Clin Genet.* 1987 Dec; 32(6):398-402.
- Geven WB, Monnens LA, Willems JL.* Magnesium metabolism in childhood. *Miner Electrolyte Metab.* 1993; 19(4-5):308-13. Review.
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG.* A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians.* 1966; 79:221-35.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A.* MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.* 2000 Aug; 11(4):315-24. Review.
- Greger R.* Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch.* 1981 Apr; 390(1):30-7.
- Greger R, Schlatter E.* Cellular mechanism of the action of loop diuretics on the thick ascending limb of Henle's loop. *Klin Wochenschr.* 1983 Oct 17; 61(20):1019-27.
- Greger R.* Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev.* 1985 Jul; 65(3):760-97.
- Gregoric A, Bracic K, Novljan G, Marcun-Varda N.* Pseudotumor cerebri in a child with familial hypomagnesemia-hypercalciuria. *Pediatr Nephrol.* 2000 Mar; 14(3):269-70.
- Groenesteghe WM, Thébault S, van der Wijst J, van den Berg D, Janssen R, Tejpar S, van den Heuvel LP, van Cutsem E, Hoenderop JG, Knoers NV, Bindels RJ.* Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2007 Aug; 117(8):2260-7.
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A.* Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology.* 2004 Nov; 127(5):1386-90. Erratum in: *Gastroenterology.* 2005 Feb; 128(2):524.
- Haffner D, Weinfurth A, Manz F, Schmidt H, Bremer HJ, Mehls O, Schäfer K.* Long-term outcome of paediatric patients with hereditary tubular disorders. *Nephron.* 1999; 83(3):250-60.

- Hebert SC, Andreoli TE.* Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl⁻ absorption. *J Gen Physiol.* 1986 Apr; 87(4):567-90.
- Hebert SC.* Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int.* 1996 Dec; 50(6):2129-39. Review.
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW.* Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* 1974 Nov; 14(5):1235-44.
- Heras M, Izaguirre C, Garin A, Loris C.* Hipomagnesemia-hipercalciuria con nefrocalcinosis y alteraciones oculares. *Nefrologia* 1987; 7 [Suppl 4]: 26
- Heukeshoven J, Dernick R.* Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1985 Jun 19; 326:91-101.
- Hexum T, Samson FE Jr, Himes RH.* Kinetic studies of membrane (Na⁺-K⁺-Mg²⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1970 Aug 15; 212(2):322-31.
- Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsumi S, Sugimoto Y.* Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res.* 2000 May; 10(5):659-63.
- Hirano T, Hirotsumi S, Sasaki S, Kikuchi T, Sugimoto Y.* A new deletion mutation in bovine Claudin-16 (CL-16) deficiency and diagnosis. *Anim Genet.* 2002 Apr; 33(2):118-22.
- Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ.* The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Aug 2; 261(2):488-92.
- Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Méritat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ.* Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest.* 2003 Dec; 112(12):1906-14.
- Hoenderop JG, Bindels RJ.* Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan; 16(1):15-26. Review.

- Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM.* Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns.* 2006 Aug; 6(6):581-8.
- Hoppe B, Danpure CJ, Rumsby G, Fryer P, Jennings PR, Blau N, Schubiger G, Neuhaus T, Leumann E.* A vertical (pseudodominant) pattern of inheritance in the autosomal recessive disease primary hyperoxaluria type 1: lack of relationship between genotype, enzymic phenotype, and disease severity. *Am J Kidney Dis.* 1997 Jan; 29(1):36-44. Review.
- Hou J, Paul DL, Goodenough DA.* Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci.* 2005 Nov 1; 118(Pt 21):5109-18.
- Hou J, Shan Q, Wang T, Gomes AS, Yan Q, Paul DL, Bleich M, Goodenough DA.* Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8; 282(23):17114-22.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA.* Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest.* 2008 Feb; 118(2):619-28.
- Ikari A, Hirai N, Shiroma M, Harada H, Sakai H, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, Takagi K.* Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Dec 24; 279(52):54826-32.
- Ikari A, Matsumoto S, Harada H, Takagi K, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, Miwa M.* Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci.* 2006 May 1; 119(Pt 9):1781-9.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S.* Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003 May 15; 116(Pt 10):1959-67.
- International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes.* Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 1997 Jan; 6(1):17-26.

- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S.* Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13; 147(6):1351-63.
- Iwano M, Neilson EG.* Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004 May; 13(3):279-84. Review.
- Jarosch E, Geiss-Friedlander R, Meusser B, Walter J, Sommer T.* Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic.* 2002 Aug; 3(8):530-6. Review.
- Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res.* 2000 Dec; 48(6):754-8.
- Kanaka C, Plüss CR, Oetliker OH, Bianchetti MG.* Magnesium handling in children with primary renal abnormalities of the hydrogen ion homeostasis. *J Nephrol* 1991; 4; 257-261.
- Kang JH, Choi HJ, Cho HY, Lee JH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr Nephrol.* 2005 Oct; 20(10):1490-3.
- Karbach U, Feldmeier H.* New clinical and experimental aspects of intestinal magnesium transport. *Magnes Res.* 1991 Mar; 4(1):9-22. Review.
- Kari JA, Farouq M, Alshaya HO.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol.* 2003 Jun; 18(6):506-10.
- Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W.* Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 2006 Apr; 116(4):878-91.
- Kerstan D, Quamme G.* Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium. In: Massry SG, Morii H, Nishizawa Y (eds) *Calcium in internal medicine.* 2002. Springer-Verlag, London Berlin Heidelberg, pp 171–183
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S.* Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Apr; 13(4):875-86.

- Knohl SJ, Scheinman SJ.* Inherited hypercalciuric syndromes: Dent's disease (CLC-5) and familial hypomagnesemia with hypercalciuria (paracellin-1). *Semin Nephrol.* 2004 Jan; 24(1):55-60. Review.
- Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamaru T, Sugimoto Y.* Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Anim Genet.* 2000 Apr; 31(2):91-5.
- Köckerling A, Reinalter SC, Seyberth HW.* Impaired response to furosemide in hyperprostaglandin E syndrome: evidence for a tubular defect in the loop of Henle. *J Pediatr.* 1996 Oct; 129(4):519-28.
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschênes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F.* Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Aug; 11(8):1449-59.
- Konrad M, Weber S.* Recent advances in molecular genetics of hereditary magnesium-losing disorders. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jan; 14(1):249-60. Review.
- Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, Weber S.* Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet.* 2006 Nov; 79(5):949-57.
- Konrad M, Hou J, Weber S, Dötsch J, Kari JA, Seeman T, Kuwertz-Bröking E, Peco-Antic A, Tasic V, Dittrich K, Alshaya HO, von Vigier RO, Gallati S, Goodenough DA, Schaller A.* CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Jan; 19(1):171-81.
- Kozak M.* Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome.* 1996 Aug; 7(8):563-74. Review.
- Kutluturk F, Temel B, Uslu B, Aral F, Azezli A, Orhan Y, Konrad M, Ozbey N.* An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and

- G227R mutation of Paracellin-1. An unusual patient with hypercalciuria and hypomagnesemia unresponsive to thiazide diuretics. *Horm Res.* 2006; 66(4):175-81. Review.
- Kuwertz-Bröking E, Fründ S, Bulla M, Kleta R, August C, Kisters K.* Familial hypomagnesemia-hypercalciuria in 2 siblings. *Clin Nephrol.* 2001 Aug; 56(2):155-61.
- Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R.* Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet.* 1995 Dec 4; 59(4):454-9.
- Lee DB, Huang E, Ward HJ.* Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Jan; 290(1):F20-34. Review.
- Lee NP, Tong MK, Leung PP, Chan VW, Leung S, Tam PC, Chan KW, Lee KF, Yeung WS, Luk JM.* Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett.* 2006 Feb 6; 580(3):923-31.
- Le Grimellec C, Roinel N, Morel F.* Simultaneous Mg, Ca, P,K,Na and Cl analysis in rat tubular fluid. II. During acute Mg plasma loading. *Pflugers Arch.* 1973 May 23; 340(3):197-210.
- Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C, Roinel N, de Rouffignac C.* Developmental pattern of water and electrolyte transport in rat superficial nephrons. *Am J Physiol.* 1983 Jul; 245(1):F15-21.
- Lemmink HH, Knoers NV, Károlyi L, van Dijk H, Niaudet P, Antignac C, Guay-Woodford LM, Goodyer PR, Carel JC, Hermes A, Seyberth HW, Monnens LA, van den Heuvel LP.* Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain. *Kidney Int.* 1998 Sep; 54(3):720-30.
- Liu Y.* Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan; 15(1):1-12. Review.
- Lombeck I, Ritzl F, Schnippering HG, Michael H, Bremer HJ, Feinendegen LE, Kosenow W.* Primary hypomagnesemia. I. Absorption Studies. *Z Kinderheilkd.* 1975; 118(4):249-58.

- López-Nieto CE, Brenner BM.* Molecular basis of inherited disorders of renal solute transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997 Sep; 6(5):411-21.
- Loris Pablo C, Martín de Vicente C, Abio Albero S, Justa Roldán M, Ferrer Novella C.* [Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. Association with ocular abnormalities][Article in Spanish] *An Pediatr (Barc).* 2004 Dec; 61(6):502-8.
- Magaldi AJ, van Baak AA, Rocha AS.* Calcium transport across rat inner medullary collecting duct perfused in vitro. *Am J Physiol.* 1989 Nov; 257(5 Pt 2):F738-45.
- Mandel N.* Mechanism of stone formation. *Semin Nephrol.* 1996 Sep; 16(5):364-74. Review.
- Mandon B, Siga E, Roinel N, de Rouffignac C.* Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflugers Arch.* 1993 Sep; 424(5-6):558-60.
- Manz F, Schärer K, Janka P, Lombeck J.* Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in siblings. *Eur J Pediatr.* 1978 Jun 20; 128(2):67-79.
- Martinez ME, Salinas M, Miguel JL, Herrero E, Gomez P, Garcia J, Sanchez-Sicilia L, Montero A.* Magnesium excretion in idiopathic hypercalciuria. *Nephron.* 1985; 40(4):446-50.
- Marx SJ, Attie MF, Levine MA, Spiegel AM, Downs RW Jr, Lasker RD.* The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. *Medicine (Baltimore).* 1981 Nov; 60(6):397-412.
- Matos V, van Melle G, Boulat O, Markert M, Bachmann C, Guignard JP.* Urinary phosphate/creatinine, calcium/creatinine, and magnesium/creatinine ratios in a healthy pediatric population. *J Pediatr.* 1997 Aug; 131(2):252-7.
- Maxam AM, Gilbert W.* A new method for sequencing DNA. 1977. *Biotechnology.* 1992; 24:99-103.
- Meier W, Blumberg A, Imahorn W, De Luca F, Wildberger H, Oetliker O.* Idiopathic hypercalciuria with bilateral macular colobomata: a new variant of oculo-renal syndrome. *Helv Paediatr Acta.* 1979; 34(3):257-69.

- Meij IC, Saar K, van den Heuvel LP, Nuernberg G, Vollmer M, Hildebrandt F, Reis A, Monnens LA, Knoers NV.* Hereditary isolated renal magnesium loss maps to chromosome 11q23. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan; 64(1):180-8.
- Meij IC, Koenderink JB, van Bokhoven H, Assink KF, Groenestege WT, de Pont JJ, Bindels RJ, Monnens LA, van den Heuvel LP, Knoers NV.* Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit. *Nat Genet.* 2000 Nov; 26(3):265-6.
- Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, De Rubertis FR, Davis BB.* Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone). *Metabolism.* 1972 Oct; 21(10):905-20.
- Milla PJ, Aggett PJ, Wolff OH, Harries JT.* Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. *Gut.* 1979 Nov; 20(11):1028-33.
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM.* Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000 Aug; 279(2):G250-4. Review.
- Morger ID, Truttmann AC, von Vigier RO, Bettinelli A, Ramelli GP, Bianchetti MG.* Plasma ionized magnesium in tubular disorders with and without total hypomagnesemia. *Pediatr Nephrol.* 1999 Jan; 13(1):50-3.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S.* Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19; 96(2):511-6.
- Mourani C, Khallouf E, Akkari V, Akatcherian C, Cochat P.* [Early hypomagnesemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis: two cases in a family] *Arch Pediatr.* 1999 Jul; 6(7):748-51. French.
- Moxey-Mims MM, Stapleton FB.* Hypercalciuria and nephrocalcinosis in children. *Curr Opin Pediatr.* 1993 Apr; 5(2):186-90. Review.
- Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, Meij IC, Eggert P, Garcia-Nieto V, Hunziker W.* A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria

- abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec; 73(6):1293-301.
- Müller D, Kausalya PJ, Meij IC, Hunziker W. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel Claudin-16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail. *Hum Mol Genet.* 2006 Apr 1; 15(7):1049-58.
- Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D, Thumfart J, Meij IC, Dillon MJ, van't Hoff W, Hunziker W. Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug; 91(8):3076-9.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335-50.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature.* 2001 May 31; 411(6837):590-5. Erratum in: *Nature* 2001 Aug 9; 412(6847):660.
- Nicholson JC, Jones CL, Powell HR, Walker RG, McCredie DA. Familial hypomagnesaemia--hypercalciuria leading to end-stage renal failure. *Pediatr Nephrol.* 1995 Feb; 9(1):74-6.
- Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AW, Löffing J, Hoenderop JG, Bindels RJ. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2005 Jun; 115(6):1651-8.
- Nordin BEC. Nutritional considerations. In calcium, phosphate and Magnesium. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1976, p. 1 (ed. B.E.C. Nordin).
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T. A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics.* 2000 Sep 15; 68(3):229-36.
- Okada K, Ishikawa N, Fujimori K, Goryo M, Ikeda M, Sasaki J, Watanabe D, Takasuga A, Hirano T, Sugimoto Y. Abnormal development of nephrons in claudin-16-defective Japanese black cattle. *J Vet Med Sci.* 2005 Feb; 67(2):171-8.

- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989 Nov; 5(4):874-9.
- Ortiz A, Méndez A, Parra EG, Rodeles M, Ortiz-Arduan A.* Hipomagnesemia familiar con hipercaciuria. *Nefrologia* 1992; 12: 50-55.
- Paunier L, Radde IC, Kooh SW, Conen PE, Fraser D.* Primary hypomagnesemia with secondary hypocalcemia in an infant. *Pediatrics*. 1968 Feb; 41(2):385-402.
- Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, Davies M, Lewis-Barned N, McCredie D, Powell H, Kendall-Taylor P, Brown EM, Thakker RV.* A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*. 1996 Oct 10; 335(15):1115-22.
- Peru H, Akin F, Elmas S, Elmaci AM, Konrad M.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: report of three Turkish siblings. *Pediatr Nephrol*. 2008 Feb 6.
- Peters M, Jeck N, Reinalter S, Leonhardt A, Tönshoff B, Klaus G G, Konrad M, Seyberth HW.* Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med*. 2002 Feb 15; 112(3):183-90.
- Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG.* Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*. 1993 Dec 31; 75(7):1297-303.
- Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DE, Brandi ML, Papapoulos SE, Menko FH, Hendy GN, Brown EM, Seidman CE, Seidman JG.* Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Effects of mutant gene dosage on phenotype. *J Clin Invest*. 1994 Mar; 93(3):1108-12.
- Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG.* Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. 1994 Nov; 8(3):303-7.
- Prabakar MR, Manorajan R, Fernando ME, Venkatraman R, Balaraman V, Jayakumar M.* Nephrocalcinosis in siblings--familial hypomagnesemia, hypercalciuria with nephrocalcinosis (FHHNC syndrome). *J Assoc Physicians India*. 2006 Jun; 54:497-500.

- Praga M, Vara J, González-Parra E, Andrés A, Alamo C, Araque A, Ortiz A, Rodicio JL.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 1995 May; 47(5):1419-25.
- Quamme GA, Rabkin SW.* Cytosolic free magnesium in cardiac myocytes: identification of a Mg^{2+} influx pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Mar 30; 167(3):1406-12.
- Quamme GA.* Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int.* 1997 Nov; 52(5):1180-95. Review.
- Quamme GA, de Rouffignac C.* Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci.* 2000 Aug 1; 5:D694-711. Review.
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM.* Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 2001 Feb; 120(2):411-22.
- Raja KA, Schurman S, D'mello RG, Blowey D, Goodyer P, Van Why S, Ploutz-Snyder RJ, Asplin J, Scheinman SJ.* Responsiveness of hypercalciuria to thiazide in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 3:2938-2944.
- Ranade VV, Somberg JC.* Bioavailability and pharmacokinetics of magnesium after administration of magnesium salts to humans. *Am J Ther.* 2001 Sep-Oct; 8(5):345-57. Review.
- Reichel H, Deibert B, Schmidt-Gayk H, Ritz E.* Calcium metabolism in early chronic renal failure: implications for the pathogenesis of hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant.* 1991; 6(3):162-9.
- Reinhart SC, Norden AG, Lapsley M, Thakker RV, Pang J, Moses AM, Frymoyer PA, Favus MJ, Hoepner JA, Scheinman SJ.* Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5:1451-1461.
- Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L.* The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 2002 Aug; 62(2):476-87.

- Rocha AS, Kokko JP.* Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest.* 1973 Mar; 52(3):612-23.
- Richard O, Freycon MT.* [Congenital tubulopathy with magnesium loss] *Pediatrie.* 1992; 47(7-8):557-63. French. Review.
- Rodríguez-Soriano J, Vallo A.* Pathophysiology of the renal acidification defect present in the syndrome of familial hypomagnesaemia-hypercalciuria. *Pediatr Nephrol.* 1994 Aug; 8(4):431-5.
- Rodríguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M.* Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol.* 1987 Jul; 1(3):465-72. Review.
- Runeberg L, Collan Y, Jokinen EJ, Lähdevirta J, Aro A.* Hypomagnesemia due to renal disease of unknown etiology. *Am J Med.* 1975 Dec; 59(6):873-81.
- Ryan MF.* The role of magnesium in clinical biochemistry: an overview. *Ann Clin Biochem.* 1991 Jan; 28 (Pt 1):19-26.
- Ryzen E, Elbaum N, Singer FR, Rude RK.* Parenteral magnesium tolerance testing in the evaluation of magnesium deficiency. *Magnesium.* 1985; 4(2-3):137-47. Erratum in: *Magnesium* 1987; 6(3):168.
- Sanger F, Coulson AR.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25; 94(3):441-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec; 74(12):5463-7.
- Sanjad SA, Hariri A, Habbal ZM, Lifton RP.* A novel PCLN-1 gene mutation in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and atypical phenotype. *Pediatr Nephrol.* 2007 Apr; 22(4):503-8.
- Sasaki Y, Kitagawa H, Kitoh K, Okura Y, Suzuki K, Mizukoshi M, Ohba Y, Masegi T.* Pathological changes of renal tubular dysplasia in Japanese black cattle. *Vet Rec.* 2002 May 18; 150(20):628-32.
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M.* Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused

- by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* 2002 Jun; 31(2):166-70.
- Schlingmann KP, Konrad M, Seyberth HW.* Genetics of hereditary disorders of magnesium homeostasis. *Pediatr Nephrol.* 2004 Jan; 19(1):13-25. Review.
- Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A.* The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 1987 Jun; 34(3):571-90.
- Seyberth H, Soergel M, Koeckerling A.* Hypokalaemic tubular disorders: the hyperprostaglandin E syndrome and Gitelman-Bartter syndrome. In: Davison A, Cameron J, Grünfeld J, Kerr D, Ritz E, Winearls C (eds) *Oxford textbook of clinical nephrology.* Oxford University Press, 1998 Oxford, pp 1085–1093
- Shafik IM, Green G.* Effects of magnesium on renal calcium excretion. *Kidney Int* 31: 357
- Shalev H, Phillip M, Galil A, Carmi R, Landau D.* Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia. *Arch Dis Child.* 1998 Feb; 78(2):127-30.
- Shareghi GR, Agus ZS.* Magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the rabbit. *J Clin Invest.* 1982 Apr; 69(4):759-69.
- Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, Sherbotie JR, Foreman JW, Przysiecki C, Neilson EG, et al.* Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 1; 89(1):426-30.
- Sikora P, Borzecka H, Kollataj B, Majewski M, Wieczorkiewicz-Płaza A, Zajaczkowska M.* [The diagnosis of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in a girl with acute lymphoblastic leukemia--case report] Polish. *Pol Merkur Lekarski.* 2006 Apr; 20(118):430-2.
- Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitleman HJ, Lifton RP.* Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet.* 1996 Jan; 12(1):24-30.

- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP.* Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet.* 1996 Jun; 13(2):183-8.
- Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP.* Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet.* 1996 Oct; 14(2):152-6.
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet.* 1997 Oct; 17(2):171-8.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP.* Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science.* 1999 Jul 2; 285(5424):103-6.
- Sitia R, Braakman I.* Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 2003 Dec 18; 426(6968):891-4. Review.
- Staiger K, Staiger H, Haas C, Thamer C, Risler T, Machicao F, Häring HU.* Hypomagnesemia and nephrocalcinosis in a patient with two heterozygous mutations in the CLDN16 gene. *J Nephrol.* 2007 Jan-Feb; 20(1):107-10.
- Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV.* Genetics of hypercalciuric nephrolithiasis: renal stone disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov; 1116:461-84. Review.
- Sutton RA, Watson L.* Urinary excretion of calcium and magnesium in primary hyperparathyroidism. *Lancet.* 1969 May 17; 1(7603):1000-3.
- Sutton RA, Domrongkitchaiporn S.* Abnormal renal magnesium handling. *Miner Electrolyte Metab.* 1993; 19(4-5):232-40. Review.
- Tajima T, Nakae J, Fujieda K.* Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr Nephrol.* 2003 Dec; 18(12):1280-2.
- Tasic V, Dervisov D, Koceva S, Weber S, Konrad M.* Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study. *Pediatr Nephrol.* 2005 Jul; 20(7):1003-6.

- Torralbo A, Pina E, Portolés J, Sánchez-Fructuoso A, Barrientos A.* Renal magnesium wasting with hypercalciuria, nephrocalcinosis and ocular disorders. *Nephron*. 1995; 69(4):472-5.
- Tsien RY.* Intracellular measurements of ion activities. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 1983; 12:91-116. Review.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M.* Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Apr; 2(4):285-93. Review.
- Türkmen M, Kasap B, Soylu A, Böber E, Konrad M, Kavukçu S.* Paracellin-1 gene mutation with multiple congenital abnormalities. *Pediatr Nephrol*. 2006 Nov; 21(11):1776-8.
- Turksen K, Troy TC.* Barriers built on claudins. *J Cell Sci*. 2004 May 15; 117(Pt 12):2435-47. Review. Erratum in: *J Cell Sci*. 2004 Aug 15; 117(Pt 18):4341.
- Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM.* Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic*. 2004 Nov; 5(11):821-37. Review.
- Ulmann A, Hadj S, Lacour B, Bourdeau A, Bader C.* Renal magnesium and phosphate wastage in a patient with hypercalciuria and nephrocalcinosis: effect of oral phosphorus and magnesium supplements. *Nephron*. 1985; 40(1):83-7.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S.* ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*. 2006 Aug 25; 126(4):741-54.
- Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM.* Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec; 285(6):F1078-84.
- Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM.* The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol*. 2004 May 1; 199(1):29-38.
- Van Itallie CM, Anderson JM.* Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68:403-29. Review.

- Vargas-Poussou R, Cochat P, Le Pottier N, Roncelin I, Liutkus A, Blanchard A, Jeunemaître X.* Report of a family with two different hereditary diseases leading to early nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol.* 2008 Jan; 23(1):149-53.
- Velázquez H.* Thiazide diuretics. *Ren Physiol.* 1987; 10(3-4):184-97. Review.
- Vezzoli G, Soldati L, Gambaro G.* Hypercalciuria revisited: one or many conditions? *Pediatr Nephrol.* 2008 Apr; 23(4):503-6.
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG.* TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem.* 2004 Jan 2; 279(1):19-25.
- Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW.* Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch.* 2002 Jun; 444(3):411-8.
- Walder RY, Shalev H, Brennan TM, Carmi R, Elbedour K, Scott DA, Hanauer A, Mark AL, Patil S, Stone EM, Sheffield VC.* Familial hypomagnesemia maps to chromosome 9q, not to the X chromosome: genetic linkage mapping and analysis of a balanced translocation breakpoint. *Hum Mol Genet.* 1997 Sep; 6(9):1491-7.
- Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC.* Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet.* 2002 Jun; 31(2):171-4.
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, Meij II, Knoers NV, Cochat P, Suláková T, Bonzel KE, Soergel M, Manz F, Schaerer K, Seyberth HW, Reis A, Konrad M.* Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet.* 2000 Jun; 8(6):414-22.
- Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, Bonzel KE, Seeman T, Suláková T, Kuwertz-Broeking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Schärer K, Seyberth HW, Konrad M.* Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Sep; 12(9):1872-81.
- Weber S, Schlingmann KP, Peters M, Nejsum LN, Nielsen S, Engel H, Grzeschik KH, Seyberth HW, Gröne HJ, Nüsing R, Konrad M.* Primary gene structure and

- expression studies of rodent paracellin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec;12(12):2664-72.
- White TJ, Arnheim N, Erlich HA.* The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 1989 Jun; 5(6):185-9. Review.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB.* Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell.* 2001 Jan 12; 104(1):165-72.
- Wolf MT, Dötsch J, Konrad M, Böswald M, Rascher W.* Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr Nephrol.* 2002 Aug; 17(8):602-8.
- Wong V, Goodenough DA.* Paracellular channels! *Science.* 1999 Jul 2; 285(5424):62.
- Worcester EM, Blumenthal SS, Beshensky AM, Lewand DL.* The calcium oxalate crystal growth inhibitor protein produced by mouse kidney cortical cells in culture is osteopontin. *J Bone Miner Res.* 1992 Sep; 7(9):1029-36.
- Wrong O.* Nephrocalcinosis. In: *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 2nd Ed., edited by Davison AM, Cameron JS, Grünfeld J-P, Kerr DNS, Ritz E, Winearls CG, Oxford, UK, Oxford University Press, 1998, pp1376 -1396
- Zeisberg M, Kalluri R.* The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med.* 2004 Mar; 82(3):175-81. Review.
- Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC, Boyle MP, Lee CK, Brass-Ernst L.* Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther.* 2002 Jul; 6(1):119-26.
- Zelikovic I, Szargel R, Hawash A, Labay V, Hatib I, Cohen N, Nakhoul F.* A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int.* 2003 Jan; 63(1):24-32.
- Zimmermann B, Plank C, Konrad M, Stöhr W, Gravou-Apostolatou C, Rascher W, Dötsch J.* Hydrochlorothiazide in CLDN16 mutation. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Aug; 21(8):2127-32.

7 Anhang

7.1 Originalfragebogen

Questionnaire

Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis

I. General Information

Sex: ☐ female ☐ male
Konsanguinity: ☐ yes ☐ no ☐ possible
Ethnic origin:

II. Cardinal Symptoms

Please note in () month/year of measurement/first diagnosis/onset !

- 1. Hypomagnesemia?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
Hypermagnesiuria? ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
Hypercalciuria? ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
Nephrocalcinosis? ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
Actual renal function? ☐ normal ☐ CRF ☐ Dialysis ☐ TPL
- 2. Serum-magnesium (range)?** mmol/l ()
Serum-calcium (range)? mmol/l ()
Serum-potassium (range)? mmol/l ()
Urinary magnesium excretion ()
Urinary magnesium/creatinine ratio?mmol/mmol ormg/mg ()
Urinary calcium excretion ()
Urinary calcium/creatinine ratio?mmol/mmol ormg/mg ()
- 3. Acid-base-metabolism** ☐ metabolic acidosis ☐ metabolic alkalosis ☐ balanced
Renal function at time of measurement? ()
- 4. Isosthenuria?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
- 5. Polyuria/polydipsia?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()

7. **Nephrolithiasis ?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
8. **Urinary tract infections?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
9. **Incomplete distal tubular acidosis?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- Acid loading test performed?** ☐ yes ☐ no ()
10. **Hypocitraturia?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
11. **Muscular tetanies?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
12. **Cerebral cramps?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
13. **Episodes of abdominal pain?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
14. **Eye affections typical for FHHNC?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
- Nystagmus? ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- Coloboma? ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- Myopia? ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- Further eye symptoms?** ()
15. **Hyperparathyroidism?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- If yes,** ☐ before ☐ or ☐ after
- onset of chronic renal failure (CRF)?**
- If hyperparathyroidism has occurred before onset of CRF, please note measured value and date of measurement: ()
16. **Hyperuricemia?** ☐ yes ☐ no ☐ unknown ()
17. **Additional analysis** (please not value and date of measurement if available) :
- Renin:** ()
- Aldosterone:** ()
- Vitamin D metabolites:** ()
- ()
- Urinary prostaglandins:** ()
- ()

- 18. Has renal biopsy been performed in your patient** (please note results of histopathology if available and date of biopsy)?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

.....
.....
.....
.....
.....

- 19. Does your patient present further symptoms not mentioned before** (please note date of onset)?

.....
.....
.....
.....

III. Detailed Information

A

Onset of chronic renal failure?

Onset of dialysis?

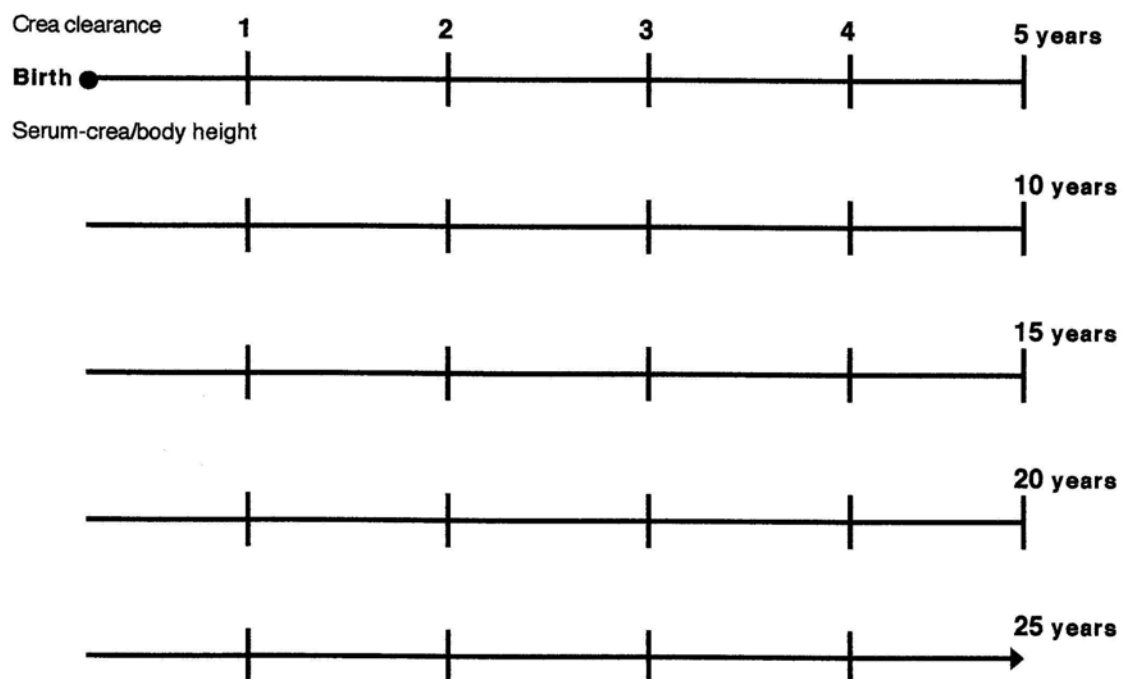
Date of renal transplantation?

B

Please note as many values as possible of creatinine clearances during childhood/youth of your patient (creatinine clearance in ml/min/1,73 m²)

(alternatively, you may note serum-creatinine values and body height of the patient).

As this information is very important for genotype-phenotype analysis, we are very thankful for your effort!



IV. Family History

A

Is hypercalciuria known in the (also more distantly related) family?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

Who is affected?.....

Is nephrolithiasis known in the (also more distantly related) family?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

Who is affected?.....

Is there a positiv family history for recurring urinary tract infections?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

Who is affected?.....

Is there a positiv family history for medullary sponge kidneys?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

Who is affected?.....

Is there a positiv family history for other kidney diseases?

☐ yes ☐ no ☐ unknown

Which kind of renal disease?.....

Who is affected?

B

The following data regarding hypercalciuria and nephrocalcinosis in closely related family members is very important for the evaluation of symptoms in heterozygous *PCLN-1* mutation carriers.

If it is possible for you to analyze the urine (calcium and creatinine excretion) and to perform renal ultrasound in the healthy family members, we would be very thankful for this essential information!

Calcium/creatinine ratio in the urine? (please note date of examination in parenthesis):

Father:.....

Mother:.....

Siblings:.....

a)Name:.....

b)Name:.....

c)Name:.....

d)Name:.....

Renal sonography (Nephrocalcinosis? Cysts? Further anomalies?)

(please note date of examination in parenthesis):

Father:.....

Mother:.....

Siblings:.....

a)Name:.....

b)Name:.....

c)Name:.....

d)Name:.....

C

If you have already acquired data referring to the following parameters, you may fill in known values.

Minimal serum-magnesium ?

(please note date of examination in parenthesis)

Father:.....

Mother:.....

Siblings:.....

Creatinine clearance?

(please note date of examination in parenthesis)

Father:.....

Mother:.....

Siblings:.....

Magnesium excretion in the urine?

(please note date of examination in parenthesis):

Father:.....

Mother:.....

Siblings:.....

Further comments

.....

.....

.....

.....

7.2 Verwendete Abkürzungen

A	Absorption
aBS	Antenatales Bartter Syndrom
ADH	Autosomal dominanter Hypoparathyreodismus
ADHH	Autosomal dominante hypokalziämische Hyperkalziurie
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSND	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness (Barttin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adeninmonophosphat
CaSR	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -sensing-Rezeptor
cBS	klassisches Bartter Syndrom
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CINF	chronisch interstitielle Nephritis mit diffuser zonaler Fibrose
CIC	renaler Chloridkanal (Ka und Kb)
CLCNKB	renaler Chloridkanal Kb (Gen)
CLDN16	Claudin-16
cm	centimeter
cTAL	kortikales Segment des dicken aufsteigenden Teil der Henle' Schleife
Cy5	Cyanin-5
DCT	Distal convoluted Tubulus- distal gewundener Tubulus

ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dRTA	distale renale tubuläre Azidose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelialer zu mesenchymaler Transformation
ENaC	SCNN1G (sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma)
evtl.	eventuell
F1....	Familie 1....
FHH	Familiäre hypokalziurische Hyperkalziämie
FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinos
fs	frameshift
FXD2	FXD domain containing ion transport regulator 2
G	Fallbeschleunigung $G=9,81\text{m/s}^2$
g	Gramm
GFR	Glomerulären Filtrationsrate
GS	Gitelman Syndrom
HHRH	hyperphosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie
HPS	Hyperprostaglandin E Syndrom
HS	Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie
iPTH	intaktes Parathormon
i. v.	intravenös
kb	Kilobasen

kbp	Kilobasenpaare
KCNJ1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1
kD	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LLC-PK1	Zelllinie des proximalen Tubulus von Schweinenieren
m ²	Quadratmeter
mA	miliAmpere
MDCK	Madin-Darby canine kidney (cells)
Met	Methionin
mg	milligram
µg	mikrogramm
min	Minute
ml	mililiter
µl	mikroliter
µM	Mikromolar
MLT	Magnesiumbelastungstest (magnesium loading test)
mM	millimolar
mm	millimeter
mmol	millimol
mRNA	messenger RNA
MSK	Markschwammniere
mTAL	medulläres Segment des dicken aufsteigenden Teil der Henle' Schleife
mV	millivolt
NaCl	Natriumchlorid

NCCT	Na ⁺ /Cl ⁻ -Co-Transporter
ng	nanogramm
NKCC2	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Co-Transporter Typ 2
no.	engl. Number, Nummer
NSHPT	Neonataler schwerer Hyperparathyreodismus
OD	optische Dichte Einheit
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	kurzer Arm der Chromosomen
P	Permeabilität
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
4-PBA	4-Phenylbutyrat
PCLN-1	Paracellin-1
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDZ	postsynaptic density 95/ <u>d</u> iscs large/ <u>z</u> onula occludens-1
pg	picogramm
PKA	Proteinkinase A
pmol	picomol
PTH	Parathormon
q	langer Arm der Chromosomen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference – ein Mechanismus, um Genexpression zu inhibieren
ROMK	renalер Kaliumkanal
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SLC12	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), (A1, member 1 und A3, member 3)

SND	Sensorineurale Taubheit
SSCP	single-strand conformation polymorphism (Einzelstrang-Konformationspolymorphismen)
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAL	dicker aufsteigender Teil der Henle' Schleife (thick ascending limb)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TJ	Tight Junction
TRP	Transient receptor potential
TRPM	Transient receptor potential (melastatin)
TRPV5	transient receptor potential vanilloid channel 5
TRV	Threonin-Arginin-Valin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZO	zonula occludens

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Behr, Berger, Beyer, Bien, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Engenhart-Cabillic, Fischer, Geus, Gemsa, Görg, Gotzen, Gress, Gressner, Griss, Happle, Hasilik, Hertl, Hörsch, Hofmann, Hoyer, Joseph, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, Konrad, Krause, Kretschmer, Kroll, Kuhlmann, Lange, Lennartz, Lorenz, Koolmann, Maisch, Maier, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Printz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schneider, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Simon, Slenczka, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, von Wichert, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

7.4 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. H. W. Seyberth möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. med. Martin Konrad und Frau Dr. med. Stefanie Weber für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während deren Durchführung. Sie standen stets und in vielfacher Hinsicht als Ansprechpartner zur Verfügung und unterstützten mich beim Erstellen der Arbeit und darüber hinaus mehr, als zu verlangen war.

Frau Ulla Pechmann und Frau Nora Alffen möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die molekularbiologischen Techniken und die Betreuung während der Durchführung der Experimente danken. Ihr Einsatz war für den Fortgang der Arbeit von großem Wert.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. med. Melanie Heß und Herrn Dr. med. Karl Peter Schlingmann und den Mitarbeitern des Labors für die hilfsbereite Zusammenarbeit und das angenehme stets produktive Arbeitsklima.

Herrn Dr. med. Tillmann Bert danke ich für seine persönliche Unterstützung und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit. Er war mir stets eine große Hilfe.

Zu guter Letzt bin ich meinen Eltern zu größtem Dank verpflichtet. Sie haben mich in jeder Hinsicht unterstützt, und es mir ermöglicht, den Weg bis hierher zu gehen.